

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Dr. h.c. Jörg A. Auer, MS, Dipl. ACVS/ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

***Osseointegration von Titanimplantaten (Spine Cages)
funktionalisiert mit Kollagen I/ Chondroitinsulfat und
Bisphosphonat bei einer anterioren Wirbelfusion der
Lendenwirbelsäule des Schafes***

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse Fakultät
Universität Zürich

vorgelegt von
Inga Rath
Tierärztin
aus Bremen (Deutschland)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. Dr. med. Thomas Steffen, Korreferent

Zürich 2010

In Liebe
meiner Familie

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Ziel der Studie	3
1.2 Wirbelfusion	4
1.3 Implantatsysteme	6
1.4 Verwendung von autologem Knochen und Alternativen	7
1.5 Bioaktive Beschichtungen	9
1.5.1 Kollagen I/Chondroitinsulfat	10
1.5.2 Bisphosphonat	11
1.6 Tiermodell	12
2 Material und Methoden	12
2.1 Aufbau des Versuchs	12
2.2 Implantate	13
2.3 Beschichtungen	14
2.3.1 Kollagen Type I / Chondroitinsulfat	14
2.3.2 Bisphosphonat	14
2.4 Gruppeneinteilung der Versuchstiere	15
2.5 Vorbereitung	15
2.6 Operation	16
2.7 Probengewinnung und Aufbereitung	19
2.8 Auswertung	22
2.8.1 Radiologie	22
2.8.2 Qualitative Beurteilung	23
2.8.3 Quantitative Beurteilung	23
2.8.4 Statistik	24
3 Resultate	24
3.1 Operation und postoperative Phase	24
3.2 Makroskopische Beurteilung	26
3.3 Radiologische Beurteilung	26
3.4 Histologische Beurteilung	27
3.4.1 Qualitative Beurteilung	27
3.4.2 Quantitative Beurteilung	28
3.4.3 Semiquantitative Zell-Beurteilung	29
3.5 Statistik	30
4 Diskussion	30
4.1 Ziel der Studie	30
4.2 Tiermodell	32
4.3 Operation und Implantat	33
4.4 Histologie	34
4.5 Wirkung der Beschichtungen	36
4.6 Schlussfolgerung	36
5 Anhang	38
5.1 Abkürzungsverzeichnis	38

Inhaltsverzeichnis

5.2	Tabellen.....	39
5.3	Abbildungen	40
<hr/>		
6	Literaturverzeichnis	47
	Danksagung.....	51
	Curriculum Vitae.....	52

Zusammenfassung

Für eine anteriore interkorporelle Wirbelfusion in der Lendenwirbelsäule ist die Osseointegration des Implantates (Spine Cage) entscheidend. Alternativen zur autologen Knochentransplantation werden gesucht, um sekundäre Morbidität der Graftentnahme zu vermeiden.

Zwei pharmakologisch beschichtete und ein unbeschichtetes Cage wurden auf ihre Osseointegration verglichen: KollagenI/Chondroitinsulfat (K/CS) und Bisphosphonat (BP). Neun Schafen wurde für 3 Monate jeweils ein beschichtetes und unbeschichtetes Implantat als Kontrolle eingesetzt. Osseointegration (Knochenanwachs) wurde mit antero-posterioren Implantatquerschnitten in Relation zum Cage quantitativ bewertet. Gewebearten im Inneren des Cages wurden kategorisiert.

Die histologischen Schnitte waren technisch sehr gut. Das Anwachsverhalten für die beiden Beschichtungen war statistisch nicht verschieden. Die BP-beschichtung zeigte nur eine Tendenz zu vermehrtem Knochenwachstum im Inneren des Cages, während die ungewollte Füllung der Hohlräume des Implantats mit K/CS möglicherweise das Einwachsen von Knochengewebe verhinderte. Die Ergebnisse wiesen extreme Variabilität, was auf die geringe Tierzahl, auf Defizite in Form und Größe der Cages und auf die schwierige Insertionsmethode mit resultierender Bewegung des Cages zurückgeführt wurde.

Folgeprojekte sollten in einem besser standardisierten Cage-Modell durchgeführt werden. Die histologische Methode hat sich bewährt und kann weiter eingesetzt werden.

Summary

A solid osseointegration of the intercorporal implant (Spine Cage) is the most important criteria in spinal fusion. This is why alternatives to autogenous bone grafts are being explored. Cages with two different surface coatings were tested and compared in a sheep model for lumbar spinal fusion. The titanium implants had been coated with either collagenI/chondroitin sulfate (K/CS) or with bisphosphonate (BP). In nine sheep one coated and one uncoated cage each were implanted for three months. Osseointegration was evaluated quantitatively measuring the bone implant contact surface in anteroposterior histological slices oriented with reference to the implant. In addition, tissue types grown into the cages were categorized.

The histological slices were technically of good quality. The results of the bone implant contact surface showed no significant differences among the groups. However, BP-coated implants showed a tendency to generate increased bone matrix inside the cage. A reason for this trend might be that the K/CS- coating plugged the implant voids and thus interfered with bony ingrowth.

The large variability in results suggests that multiple factors such as surgical difficulties to place the implant, shortcomings in the cage design and the low animal numbers were limiting to a conclusive study outcome. Future studies would benefit from a better standardized cage model. The histological technique was successful and can be applied without modification for future studies.

1 Einleitung

Wirbelsäulenerkrankungen beim Menschen sind heutzutage häufig auftretende, entweder degenerative oder traumatische Veränderungen, die in zunehmendem Maße chirurgisch behandelt werden^{1,2}. Eine der chirurgisch angewandten Methoden ist die interkorporelle Wirbelversteifung der Lendenwirbelsäule mit der Insertion eines sogenannten „Spine Cage“, welcher durch einen anterioren Zugang eingebracht wird. Diese Methode in unserem Modell wird auch als „anterior lumbar interbody fusion“ (ALIF) bezeichnet³.

Das Spine Cage ist ein dreidimensionales Implantat mit Hohlräumen, das bei der Wirbelfusion knöchern integriert werden soll. Die Osseointegration des Implantates kann durch unterschiedliche Methoden beeinflusst werden, von denen das autologe Knochengraft als Füllung des Spine Cages bis zum heutigen Zeitpunkt als Gold-Standard gilt.

Kollagen I/Chondroitinsulfat und Bisphosphonat sind pharmakologisch wirksame Beschichtungen auf den hier verwendeten Implantaten, welche die Osseointegration fördern sollen und in dieser Studie erstmals im Wirbelsäulenbereich eingesetzt wurden (siehe Kapitel 1.5).

Die Anwendung von Spine Cages im Schafmodell ermöglicht eine zusätzliche histologische Beurteilung der Wirbelfusion, die für die Beurteilung von knochenwachstumfördernden Substanzen essentiell ist⁴.

1.1 Ziel der Studie

Das wissenschaftlich technische Ziel dieser Studie war, zwei verschiedene pharmakologisch modifizierte Implantatsysteme (Kollagen I/ Chondroitinsulfat und Bisphosphonat) in Bezug auf ihre osseointegrativen Fähigkeiten in der Lendenwirbelsäule von Schafen zu evaluieren und mit einem unbeschichteten Implantat desselben Typs zu vergleichen. Dabei wurden eigens für Schafe hergestellte Implantate mit neuer Geometrie und Innenstruktur verwendet.

Ausgangspunkt war die Annahme, dass die pharmakologisch beschichteten Implantate mit ihren unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheiten ein besseres Einheilverhalten, entsprechend ihren Eigenschaften, zeigen würden^{5,6}. Bei den mit Bisphosphonat beschichteten Implantaten wurde z.B. aufgrund der bekannten suppressiven Wirkung auf Osteoklasten und aktivierenden Wirkung auf Osteoblaste

eine Erhöhung der Knochendichte in Implantatnähe und somit eine schnellere Osseointegration erwartet. Bei den mit Kollagen beschichteten Implantaten wurde eine verbesserte Adhäsion und Proliferation der Osteoblasten erwartet. Zusätzlich wurde innerhalb der Cages mit einer vermehrten Knochenneubildung gerechnet.

Für die Auswertung wurde erstmals ein neues Konzept der Schneidetechnik angewandt, um vergleichbare Schnitte des Implantates anfertigen zu können. Das Implantat mit umgebendem Gewebe wurde so fixiert, dass Schnittebenen in Relation zum Implantat angefertigt werden konnten. Diese zeigten eine standardisierten anteroposteriore Schnittebene durch das Spine Cage, anhand derer eine quantitative Auswertung der Knochenmenge im Kontakt zum Implantat und eine Beurteilung der Gewebe im Inneren des Cages möglich war.

1.2 Wirbelfusion

Eine Wirbelfusion ist die Versteifung zweier aufeinander folgender Wirbelkörper durch eine sekundäre knöcherne Verbindung. Diese kann durch verschiedene chirurgische Stabilisierungsmethoden erreicht werden. Eine dieser Methoden beruht auf der Insertion von Implantaten, die nach Entfernung der Bandscheibe in den Zwischenwirbelkörperspalt eingebracht werden und eine initiale Versteifung bewirken. Darauf folgt im Idealfall eine komplette sekundäre knöcherne Fusion durch und um das Spine Cage. Zur Erreichung dieser maximalen Stabilität können knochenwachstumsfördernde Substanzen als Füllung oder Beschichtung des Spine Cages eingesetzt werden.

Wirbelversteifungen können mit interkorporellen Spine Cages durchgeführt werden wie bei der ALIF, optional zusätzlich mit anterioren interkorporellen Platten zur Verstärkung oder kombiniert mit einer posterioren lumbalen Fusion (PLF) mit sogenannten „Pedicule Screws“. Im Folgenden wird nur auf die interkorporelle Versteifung eingegangen. Die ALIF wird bei Degeneration mit oder ohne Instabilität, insbesondere bei einer isolierten degenerativen Bandscheibenerkrankung mit Bandscheibenkollaps und bei Spondylolisthesis, dem so genannten Wirbelgleiten, als Therapiemethode eingesetzt, wenn eine konservative Therapie mit Physiotherapie und gegebenenfalls Steroidinjektionen nicht erfolgreich ist⁷. Als weitere Indikationen gelten die instabile spinale Stenose, das „failed back surgery syndrome“ und traumatische Wirbelfrakturen^{8,9}.

Mehrere Studien vergleichen die Risiken und Nachteile einer chirurgischen

Versorgung mit einer konservativen Behandlungsmethode und kommen zu gegenteiligen Ergebnissen. Thome et al. berichtet, eine chirurgische Versorgung sei nur bei einer eindeutig feststellbaren Lokalisation einer Läsion sinnvoll¹, während in anderen Studien festgestellt wird, dass eine chirurgische Versorgung aufgrund hoher Komplikationsraten nicht signifikant besser als eine konsequente konservative Therapie ist^{10,11}. Bei Loguidice et al. führte die chirurgische Versorgung sowohl zu einem radiologisch als auch klinisch guten Ergebnis¹².

Prognostisch günstig und wirkungsvoll ist eine Wirbelfusion in einem Bereich der Wirbelsäule, an der natürlicherweise wenig Bewegung in der Wirbelsäule herrscht, deshalb kann dort eine Fusion mit „stand alone“ Cages (interkorporelle Cages ohne zusätzliche Fixation) erfolgen³.

Die ALIF kann sowohl transabdominal als auch retroperitoneal durchgeführt werden. Beim Schaf kommt wegen des voluminösen Verdauungssystems vor allem der retroperitoneale Zugang zur Lendewirbelsäule in Frage¹³. Dieser schont auch beim Menschen die funktionelle Integrität der Bauchwand und im Vergleich zum posterioren Zugang die Rückenmuskulatur. Dadurch wird eine schnellere Rehabilitation des Patienten ermöglicht^{9,14}. Bei optimalem Verlauf tritt bei der ALIF nur ein geringer Blutverlust auf, jedoch besteht ein größeres Verletzungsrisiko der großen Gefäße und des vegetativen Nervenplexus. Beim Menschen tritt in seltenen Fällen als Komplikation eine sexuelle Dysfunktion auf, die sich beim Mann in retrograder Ejakulation äußert^{12,14}.

Die Erfolgsquote der Fusion liegt mit gleichzeitiger Verwendung eines autologen Knochengrafts, das im Spine Cage platziert wird, bei 95%⁷ und bei der Anwendung einer endoskopisch durchgeführten minimal-invasiven ALIF, ebenfalls mit autologem Knochengraft bei 91%¹⁵. Das größte Risiko der ALIF ist die Non-Union, die eine Reoperation und Anwendung einer aufwendigeren Methode der Wirbelfusion nötig macht. Oft werden dann kombinierte Techniken verwendet, um eine erfolgreiche Fusion durch erhöhte Stabilisation zu erreichen, meist eine posterolaterale Fusion (PLF) mit einer ALIF⁷.

Risiken, die das Spine Cage betreffen, sind neben den schon erwähnten perioperativen Komplikationen auch postoperative. Hier kann es zur Dislokation des Cages mit den möglichen Folgen einer Nerveneinklemmung oder sogar zum Implantatversagen (Bruch) des Cages kommen. Eine Reoperation in diesem Gebiet ist immer mit erheblichen Risiken verbunden, da die ursprüngliche Anatomie durch die

primäre Operation maßgeblich verändert wurde und im gesamten Operationsgebiet Vernarbungen zu erwarten sind⁹.

Dabei ist es für die Stabilisation des Implantates im Zwischenwirbelspalt wichtig, das Einsinken des Implantates in die Wirbelkörperendplatten zu verhindern, da beim Einsinken in das spongiöse Knochengewebe des Wirbelkörpers sowohl die Abstützfunktion als auch die Stabilisation verloren geht. Eine Kontraindikation der ALIF ist eine Osteoporose, da die Wirbelkörper und deren Endplatten in diesem Fall weniger widerstandsfähig sind und ein Einsinken stark begünstigen¹⁶.

1.3 Implantatsysteme

Interkorporelle Wirbelsäulenimplantate werden entweder von anterior oder von posterior eingesetzt. Es gibt viele verschiedene Formen von Spine Cages, die alle darauf abgestimmt sind, eine Distraction der Wirbelkörper hervorzurufen und sichere Stabilität zu gewährleisten, die eine knöcherne Überbrückung ermöglicht. Die Form der Implantate ist entweder zylindrisch, konisch oder boxförmig. Die so genannten „standalone“ Spine Cages, die ohne zusätzliche posteriore oder anteriore Stabilisationstechniken funktionieren, sind entweder in den Zwischenwirbelspalt eingedreht, eingepresst oder zusätzlich mit Schrauben fixiert¹³. Eine zusätzliche anteriore oder posteriore Fixation ist jedoch laut Lund et al. auch im Lendenwirbelbereich zu empfehlen, da sie zu einer erhöhten initialen Stabilität führt¹⁷.

Früher wurden für die ALIF vorwiegend zylindrische und konische Implantate verwendet, deren Auflagefläche relativ klein ist und die häufig paarig eingesetzt wurden³. Sie haben ein erhöhtes Einsinkrisiko, da die Flächenbelastung erhöht ist, beim Einsetzen mehr kompaktes Knochenmaterial der Endplatte entfernt wird als bei boxförmigen Cages und ihre Hauptbelastung auch auf den schwächeren, inneren Teil der Wirbelkörperendplatte wirkt¹⁶.

Da der Randbereich der Wirbelkörperendplatte eine größere Stabilität bei Belastung aufweist, wurde im vorliegenden Versuch eine boxförmige, leicht keilförmige und halbkreisförmige Implantatform verwendet, die eine große Auflagefläche auch auf den Randbereichen der Endplatten aufweist und somit weniger kompakter Knochen der Endplatte entfernt werden muss¹⁸. Boxförmige Implantate haben den Vorteil einer optimaleren Kraftverteilung auf die verbleibende Wirbelkörperendplatte.

Das Cage Design mit einer hohen Porosität ermöglicht ein Durchwachsen von Knochen durch das Implantat. Von Dörner et al. zeigte in einer *in vivo* Studie an

Schaffen, dass die Porengrösse zumindest bei Keramik-Implantaten beim Knocheneinwachs- Prozess keine Rolle spielt¹⁹.

Titan oder dessen Derivate eignen sich besonders gut für Metall-Implantate. Reine Titanimplantate gibt es in vier verschiedenen Graden (1 - 4) mit aufsteigender Biokompatibilität. Diese Titanimplantate weisen eine genügend hohe mechanische Stärke und eine gute Biokompatibilität auf und werden heutzutage in fast allen Bereichen der Osteosynthese eingesetzt. Bei Kontakt mit Flüssigkeiten wie Blut bilden Titanimplantate auf ihrer Oberfläche eine Oxidschicht von drei bis fünf Nanometer, die chemisch stabil ist und *in-vivo* weiterhin zu einer Anheftung von Calcium- und Phosphationen führt. Daraufhin folgt die Adsorption von Proteinen, die Ausbildung eines Fibringerüsts, an dem Osteoblasten in Richtung Implantat einwandern können und so einen guten Knochen-Implantat Kontakt begünstigen²⁰. Modifikationen der Titanoberflächen zur Erzeugung von verschiedenen Mikrostrukturen sind weit verbreitet²¹.

Ein alternatives Material für Wirbelsäulenimplantate ist Polyetheretherketon (PEEK), welches strahlendurchlässig ist und deshalb eine bessere postoperative radiologische Darstellung der Knochenstrukturen um das Implantat ermöglicht. Das Implantat selbst hat eine vergleichbare initiale Stabilität wie ein Titanimplantat; das weichere PEEK Material führt jedoch zu weniger scharfkantigen Zähnen, die sich schlechter auf der knöchernen Endplatte verankern und daher einfacher migrieren²².

Bioresorbierbare Spine Cages wiesen bei von Krijnen et al. in einer *in-vivo* Studie an der Halswirbelsäule von Ziegen eine gleichwertige Stabilität im Vergleich zu einer Titan-Kontrollgruppe auf, jedoch zeigte sich eine geringere Fusionsrate²³. Auch eine klinische Studie mit bioresorbierbaren Spine Cages zeigte schlechtere Fusionen, verursacht durch das Auftreten von Osteolyse um das Implantat und eine unvorhersehbare Resorptionszeit²⁴.

1.4 Verwendung von autologem Knochen und Alternativen

Ab dem Jahr 1948 wurden die ersten anterioren Wirbelfusionen durchgeführt²⁵, die bis in die 80er Jahre eine hohe Non-Union Rate von etwa 44 % zeigten²⁶. Die Operation war bis in die 1990er Jahre umstritten, als die Resultate der Wirbelfusionen durch neuartige, stabile Titan-Implantate (Spine Cages) endlich verbessert werden konnten. Dabei wurde stetig nach Mitteln gesucht, die Fusion der Wirbelkörper zu beschleunigen und zu verbessern. Der Gold-Standard ist bis in die heutige Zeit die Füllung der Cages

mit autologem Knochengewebe, das vom Beckenkamm entnommen wird. Neben den positiven Effekten gibt es auch einige Probleme, die mit der Knochenentnahme verbunden sind. Abgesehen von der Verlängerung der Operationszeit kann die Knochenentnahme vom anterioren oder posterioren Beckenkamm zusätzliche postoperative Komplikationen zur Folge haben, wobei beide Lokalisationen etwa gleiche Komplikationsraten aufweisen²⁷. An erster Stelle steht bei den Komplikationen der postoperative Schmerz, der sich in 30-40% der Fälle zu einem über mehr als ein Jahr postoperativ persistierenden chronischen Schmerz entwickelt^{27,28}. In einigen Fällen tritt ein lokaler Sensibilitätsverlust oder umgekehrt sogar eine Überempfindlichkeit auf^{28,29}. Dabei scheinen Jugendliche diesen postoperativen Schmerz an der Entnahmestelle am Beckenkamm weniger zu empfinden als Erwachsene³⁰. Weitere Komplikationen sind Nahtdehiszenz und Hämatome. Ausserdem klagen ein Teil der Patienten über eine kosmetisch unbefriedigende Operationsnarbe an der Entnahmenstelle²⁹. Eine seltenere Komplikation ist die Fraktur des Beckenkamms³¹, die auch durch unvollständige oder fehlende knöcherne Rekonstruktion des Beckenkamms nach Transplantatentnahme begünstigt wird. In einer Studie von Bednar et al. wurde bei allen untersuchten Fällen (209 erwachsene Menschen) eine persistierende, radiologisch diagnostizierbare, fehlende knöcherne Rekonstruktion beschrieben³².

Alternative Methoden für die Gewinnung von autologem Knochentransplantat werden beschrieben. Unter diesen ist besonders die Trephine Technique erwähnenswert, bei der spongiöser Knochen aus einem benachbarten Lendenwirbelkörper entnommen wird. Diese zeigte auch in einer Studie von Khanna et al. akzeptable Ergebnisse, ist jedoch vor allem bei osteoporotischem Knochen mit dem Risiko einer Wirbelkompressionsfraktur verbunden³³. In einer Kadaverstudie konnte die biomechanische Stabilität des Wirbelkörpers durch Auffüllung eines so erzeugten, zylindrischen Defektes mit Knochenersatzstoffen wiederhergestellt werden³⁴.

Alternativ zu der Entnahme von Knochengewebe kommt die Aspiration von autologem Knochenmark mit den darin enthaltenen osteogenen Zellen in Frage. Diese kann ebenfalls vom Beckenknochen erfolgen oder auch vom Manubrium sterni. Peele et al. berichtet 2007 in einer Studie über die Schmerzfreiheit und den komplikationslosen Verlauf dieser Methode, mit der Einschränkung einer kosmetischen Komponente in Bezug auf die Entnahmestelle³⁵.

Die Gewinnung von osteogenen Progenitorzellen aus Knochenmarkaspirat aus einem benachbartem Wirbelkörper ist weniger traumatisch und könnte in Zukunft eine

Alternative darstellen³⁶.

Abgesehen von autologen Knochentransplantaten allein ist die Kombinationen mit synthetischem Knochenersatz möglich. So wird von Neen et al. die mögliche Kombination von einer Kollagen-Hydroxyapatitmatrix mit Knochenmarksaspirat beschrieben, die jedoch bei der PLIF zu einem schlechteren radiologischen Ergebnis führte als die Fusionen mit alleinigem autologen Knochentransplantat³⁷.

Allogene Knochengrafts wie demineralized bone matrix (DBM) und Knochenchips haben gute Ergebnisse gezeigt, bergen jedoch nach wie vor ein Risiko der HIV-Übertragung und der Immunreaktion. Die Verwendung von Allografts hat sich deshalb nicht durchgesetzt³⁸.

1.5 Bioaktive Beschichtungen

Als Alternative zum autologem Knochentransplantat im Einsatz zur Verbesserung der Osseointegration gelten Beschichtungen für Implantate, die osteoinduktiv oder osteokonduktiv wirken.

Seit einiger Zeit sind Implantate im klinischen Einsatz, die mit dem Wachstumsfaktor „bone morphogenic protein“ (BMP) beschichtet sind und ein vermehrtes Knochenwachstum in Implantatnähe hervorrufen sollen. BMP ist physiologischerweise ein Wachstumsfaktor und Bestandteil der extrazellulären Matrix, der osteoinduktiv wirkt und bereits im Jahre 1965 von Marshall Urist entdeckt wurde³⁹. Die BMPs gehören zur Superfamilie der Transforming Growth Factors (TGF), wobei bereits mehr als 18 Isoformen beschrieben sind. Vor allem BMP-2, -4, rhOP 1 und TGF-Beta 3 wurden in den letzten Jahren intensiv auf ihre Wirkung in der Knochenheilung getestet. Bereits im Einsatz in der klinischen Wirbelsäulenchirurgie sind das recombinant human bone morphogenic protein-2 (rhBMP-2) und recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1, rhBMP-7)⁴⁰. Studien belegen, dass die Effektivität von BMPs in Hinblick auf die osteoinduktive Wirkung der von autologem Knochengewebe gleichsteht⁴¹, bzw eine Kombination von beiden in kürzester Zeit zu einer soliden Fusion führt⁴². Nachteile der BMPs sind noch immer der hohe Preis und die schwierige Herstellung. Ein noch nicht absehbares Risiko birgt die potentielle Ausbildung von Antikörpern und die unerwünschte Osteoinduktion in unmittelbarer Nähe zum Wirbelkanal⁴³.

1.5.1 Kollagen I/Chondroitinsulfat

Kollagen I und Chondroitinsulfat sind Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) des Knochens und des Knorpels, die indirekt osteoinduktiv wirken können. Die Beschichtung eines Implantates schafft nach Einbringung und Kontakt mit spongiösem Knochen eine Umgebung, welche die natürlichen Verhältnisse der ECM nachahmt. Die Beschichtung ist sozusagen eine künstliche extrazelluläre Matrix, die endogene knochenwachstumsfördernde Faktoren aktiviert und diese lokal optimal wirken lässt⁴⁴.

Verschiedene Studien haben die Wirksamkeit von Kollagen I allein⁴⁵⁻⁴⁷ und in Kombination mit Chondroitinsulfat bestätigt^{48,49}; Kollagen I aktiviert zelluläre Prozesse, führt zu einer schnelleren Differenzierung von Osteoblasten, fördert den Knochenumbau und soll dadurch zu einer schnelleren Knochenanlagerung an das Implantat führen⁵⁰. Auch wurde bei der Kollagenbeschichtung auf Titanimplantaten eine antiapoptotische Wirkung auf Zellen nachgewiesen, wodurch die biologische Integration des Implantates verstärkt wird⁵¹.

Chondroitinsulfat ist ein Glycosaminoglycan, das die Differenzierung von Osteoblasten fördert. Die Kombination von Kollagen I und Chondroitinsulfat hat *in-vitro* die Anlagerung von Osteoblasten signifikant beschleunigt und verstärkt, wobei diese Anlagerung bis zu acht Tage beobachtet wurde. Die Osteoblasten produzierten während dieser Zeit achtmal mehr Osteopontin als Zellen, die nur auf Kollagen wuchsen oder Zellen von Kontrollgruppen ohne Beschichtung⁴⁹. In der neuesten Studie von Stadlinger et al. wurde Kollagen I mit Chondroitinsulfat im Bereich von Dentalimplantaten die größte osseointegrative Wirksamkeit zugestanden⁵².

Kollagen I und Chondroitinsulfat sind in ihrer Wirksamkeit sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* bestätigt worden, jedoch liegen noch keine Studien über ihren Einsatz in der Wirbelsäulenchirurgie vor.

In dieser Studie liegt das Kollagen I in der Beschichtung in Kollagenfibrillen vor, deren Struktur geordnet und nicht kovalent vernetzt ist. Dies entspricht der natürlichen Anordnung des Kollagens I und soll ein gerichtetes Knochenwachstum unterstützen. Die geordnete Struktur und nicht kovalente Vernetzung der Kollagenfibrillen ist in dieser Art neuartig. In der Literatur werden bis jetzt nur vernetzte Fibrillen⁴⁹ oder nicht Fibrillen bildendes Kollagen, vor allem Typ I und III, beschrieben^{53,54}. Auch dort wirkt das Kollagen als Gerüst, an dem Zellen in Richtung Implantat einwachsen können⁵⁵.

1.5.2 Bisphosphonat

Bisphosphonate werden generell als systemische Medikation zur Behandlung von Osteoporose eingesetzt, wobei als Indikation ihre Fähigkeit zur Verstärkung der Mineralisation bzw. zur Verhinderung von Resorption von Knochengewebe genutzt wird. Zur Anwendung kommen meist N-Bisphosphonate wie Pamidronate und Ibandronat. Es sind Pyrophosphat-Analoga, die die Aktivität von Osteoklasten unterdrücken und auch ihre Anzahl im Gewebe reduzieren. Sie haben keine nachgewiesenen negativen, toxischen Effekte, hingegen wird ein anaboler Effekt auf Osteoblasten diskutiert⁵⁶. Die osteotrope Wirkung der Bisphosphonate wird jetzt auch im Zusammenhang mit Implantaten genutzt und erhöht die Knochendichte in Implantatnähe. Die Anwendung ist interessant bei Zahn- und Hüftimplantaten, wo zahlreiche Studien positive Effekte belegen^{57,58}. Skoglund et al. nutzte Bisphosphonat sowohl systemisch als auch lokal in einer *in-vivo* Studie mit Osteosynthese Implantaten; beide Anwendungsformen erhöhten die mechanische Pull-out force (Maßeinheit für die Kraft, das Implantat herauszudrehen)⁵⁹. So zeigten Resultate in einer Studie mit Schrauben-Implantaten im Femur der Ratte, die mit Pamidronate, gebunden auf Fibrinogen und zusätzlichem Ibandronat beschichtet waren, eine um 28% höhere Pull-out Force und um 90% gesteigerte Pull-out Energy bereits zwei Wochen nach der Operation im Vergleich zu Kontrollimplantaten ohne Beschichtung⁶⁰.

Vier Wochen und zwölf Wochen nach Implantation zeigte sich ein erhöhter Knochen-Implantat Kontakt bei einer Bisphosphatbeschichtung in einer anderen Studie mit Ratten⁶¹. Der Kurzzeiteffekt von Bisphosphonat erscheint wirkungsvoll, jedoch zeigte sich der Langzeiteffekt in Bezug auf die Osseointegration als equivalent zu unbeschichteten Kontrollpräparaten⁶².

Die bisher verwendeten Aufbringungsmethoden des Bisphosphonates auf das Implantat sind mit Schwierigkeiten verbunden, da die Bindung bis jetzt nur mit Hilfe eines Substrates wie Fibrinogen⁶⁰ oder Hydroxyapatit⁶³ möglich war. Diese Bindung ist relativ schwach und führt zu einer unvorhersehbaren Löslichkeit des Bisphosphonates am Wirkungsort. Der Vorteil einer Beschichtung mit Bisphosphonat beruht jedoch auf der Hypothese, dass vor allem in der ersten Phase nach Einsetzen der Implantate ein positiver Effekt erzielt wird, indem Knochenresorption verhindert und Osteoblasten in Implantatnähe unterstützt werden sollen. Dadurch wird der negative Effekt der erhöhten oder unvorhersehbaren Löslichkeit in der Bedeutung wieder etwas relativiert.

1.6 Tiermodell

Die Muskuloskeletal Research Unit hat mit Schafen als orthopädisches Tiermodell langjährige Erfahrung. Das Schaf ist für die Beurteilung von Osteosynthese Studien besonders geeignet, da sein Knochenwachstum dem des Menschen in Bezug auf den zeitlichen Ablauf und die Morphologie stark ähnelt und auch auf den Wirbelsäulenbereich angewendet werden kann⁶⁴.

Eine wichtige Rolle in der Knochenstruktur spielen die Havers'schen Kanäle, die entwicklungsgeschichtlich bei Säugetieren ab der Größe eines Kaninchens auftreten. Das Schaf besitzt kortikalen plexiformen Knochen und betreibt Knochenumbau mit Ausbildung sekundärer Havers'scher Systeme. Die Knochenheilung erfolgt wie beim Menschen mit einem deutlichen Remodelling der Havers'schen Osteone. Dazu kommt, dass die Zeiteinheiten des Remodellings etwa denen des Menschen entsprechen, während Kaninchen, Hunde und Katzen einen deutlich höheren Knochenmetabolismus und damit eine schnellere Knochenheilung aufweisen. Das Schaf wurde schon vielfach für Knochenheilungsstudien genutzt, wobei es wichtig ist, die skelettale Reife zu beachten, die beim Schaf mit dem Alter von zwei Jahren eintritt. Zusätzlich ist das Schaf für die orthopädische Forschung ein akzeptiertes Versuchstier, da es aufgrund seines gutmütigen und genügsamen Charakters und seines starken Herdentriebes relativ einfach und vor allem artgerecht gehalten werden kann⁶⁵.

In der Wirbelsäulenforschung hat sich das Schaf mittlerweile stark etabliert, da die ovine und humane Wirbelsäule besonders im Lendenwirbelsäulenbereich große biomechanische Ähnlichkeiten aufweisen (O'Connell 2007). Dies macht das Schaf zu einem akzeptablen Modell, um auch Wirbelsäulenimplantate zu testen^{64,66,67}.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbau des Versuchs

Im vorliegenden Experiment wurden zwei verschiedene, pharmakologisch modifizierte Implantate und ein unbeschichtetes Standardimplantat zum Vergleich verwendet. Die pharmakologisch modifizierten Implantate waren mit (1) Kollagen I und Chondroitinsulfat oder mit (2) Bisphosphonat beschichtet. Diese beiden Beschichtungen haben sich in vorgängigen *in-vivo* und *in-vitro* Studien als positiv im Bezug auf die Osseointegration erwiesen⁶⁸. Bei neun Schafen wurde jeweils ein beschichtetes und ein unbeschichtetes Implantat in zwei aufeinander folgende Zwischenwirbelkörperspalten

der Lendenwirbelsäule eingesetzt und diese nach drei Monaten zu weiteren Untersuchungen entnommen.

2.2 Implantate

Das Standardimplantat in der vorliegenden Studie war ein Spine Cage, bestehend aus unbeschichtetem Titan cp Grad 4, mit den Abmessungen 26 mm Breite, 20 mm Länge, an der ventralen Kante 5 mm Tiefe, an der dorsalen Kante 3 mm (Abb.1). Das Design des Implantates wurde speziell für das Schaf entworfen und in seiner Form den anatomischen Gegebenheiten angepasst. Diese Form entspricht annähernd der einer Bandscheibe mit einem abgeflachten dorsalen Rand. Im Inneren war eine besondere Struktur mit durchgehenden Kavitäten vorhanden, um das Einwachsen von Zellen zu ermöglichen. Nach Einsetzen in den Zwischenwirbelkörperspalt sollte das Implantat zu einer stabilen Osseointegration und Wirbelfusion führen.

Im Implantat waren in drei orthogonalen Ebenen runde Bohrlöcher mit einem Durchmesser von 0,9 mm eingebracht, die im Inneren des Cages miteinander kommunizieren. Daraus ergab sich eine Porösität von 42%. Die Oberfläche bestand aus einer gleichmäßigen, nicht spezifisch veränderten Mikrostruktur und einer gezahnten Oberfläche als Makrostruktur. Das Implantat besaß ventral mittig ein Schraubengewinde mit seitlichen Einkerbungen, mit dem es auf verschiedene Halterungen unveränderlich fixiert werden konnte. Während der Operation wurde es auf einen Haltestab aufgeschraubt, nach Entfernung der Bandscheibe in den Zwischenwirbelspalt eingesetzt und der Haltestab durch Abschrauben wieder entfernt.

Um histologische Schnitte in definierten Ebenen im Cage zu erhalten, wurden zwei weitere Halterungen konstruiert: eine für das korrekte Zugsägen (Abb. 2), die andere für die Einbettung und die Anfertigung der Dickschnitte (Abb. 3). Nach der Schlachtung der Schafe wurden die Implantate mit Hilfe eines Fluoroscops in der Wirbelsäule lokalisiert (Abb. 4), das Gewinde gesäubert, eine Sägevorrichtung aufgeschraubt und die Wirbelsäulenabschnitte auf die Abmessungen zugeschnitten, die für die spätere Einbettung notwendig waren (Abb. 5). Anschließend wurde das Implantat samt umgebendem Knochen und Weichteilgewebe mit einer Schraube in der Fixationshalterung exakt eingespannt und in Polymethylmethacrylat eingegossen. Die Haltevorrichtung konnte später in der Innenlochsäge so fixiert werden, dass exakt sagittale Schnittebenen durch das Implantat möglich waren.

Vor der Implantation wurden die Spine Cages mit Isopropanol bei 40° Celsius in

einer speziellen Waschmaschine von den Produktionsrückständen gereinigt. Dieser Reinigungsvorgang ist industriell (Medtech) standardisiert und wurde vor der Beschichtung vorgenommen.

2.3 Beschichtungen

Vor der Beschichtung der Implantate wurden diese nicht weiter verändert.

2.3.1 Kollagen Type I / Chondroitinsulfat

In dieser Studie wurde säurelösliches bovines Kollagen I und als nicht kollagene Komponente der extrazellulären Matrix Chondroitinsulfat verwendet (Patentnummer WO 2007/048263). Der Beschichtungsprozess erfolgte durch Dippen und die Haftung auf der Oberfläche wurde ohne weitere Additive erreicht. Die Herstellung der Suspension erfolgte wie im nachstehenden Text beschrieben: Chondroitinsulfat in einer Konzentration von 30 µg/mg Kollagen wurde zu einer Fibrillogenese-Pufferlösung gegeben, die 2,5 mg/ml Kollagen enthielt. Die Lösung wurde über Nacht bei 37° C stehengelassen, so dass die Fibrillogenese stattfinden konnte. Das entstandene Gel wurde homogenisiert und daraufhin die Fibrillen durch Zentrifugation separiert, mit Fibrillogenese-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Fibrillen wurden wieder in den Puffer gegeben bis eine Konzentration von 5 mg/ml Kollagen erreicht war. Die Beschichtung erfolgte durch Dippen der Implantate in dieser Suspension bei 25° C für jeweils 5 Minuten und anschließendem Lufttrocknen. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt. Nach dem letzten Trocknen wurden die Implantate mit destilliertem Wasser gewaschen und sterilisiert. Das Kollagen I der Beschichtung dieser Studie lag in Kollagenfibrillen vor, deren Struktur geordnet und nicht kovalent vernetzt war.

Die Verteilung der Beschichtung wurde mit Rasterelektronenmikroskopie geprüft und eine Beschichtung auch innerhalb des Implantates festgestellt. Dazu wurde das Implantat in einer Ebene aufgesägt und es wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop digitale Aufnahmen gemacht (Abb. 6). Es wurde festgestellt, dass im dünneren dorsalen Bereich eine dichte Füllung mit Kollagenfäden vorlag (Abb. 7), während im ventralen dickeren Bereich des Implantates nur eine geringere Füllung stattgefunden hatte.

2.3.2 Bisphosphonat

Die Bisphosphonatbeschichtung erfolgte durch Aufsprühen einer Suspension mit einer Alendronate Konzentration von 10 µg/cm². Diese Suspension wurde hergestellt

durch Kombination von Alendronate Natriumsalz mit einem Natriumdocedylsulfat, so dass ein schwer lösliches Salz resultierte.

Dieses wurde in einem Sprayverfahren direkt auf das Standardimplantat aufgesprüht und haftete im Gegensatz zu ähnlichen Verfahren in der Literatur ohne Kleber^{57,60}. Nach der Beschichtung wurde deren Verteilung und Konzentration auf und im Implantat nicht weiter analysiert, wie es bei den mit Kollagen beschichteten Implantaten durchgeführt wurde.

2.4 Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Für die experimentelle Studie wurden 9 adulte Schafe im Alter von durchschnittlich 2,6 Jahren (2 Jahre und 2 Monate bis 2 Jahre und 11 Monate) und dem durchschnittlichen Gewicht von 71 kg (54-89 kg) eingesetzt, die nach einem Zeitraum von 3 Monaten getötet wurden. Pro Schaf wurde jeweils ein beschichtetes (Kollagen I /Chondroitinsulfat oder Bisphosphonat) und ein unbeschichtetes Implantat an den Lokalisationen L3/4 und L4/5 oder L4/5 und L5/6 der Lendenwirbelsäule nach Extirpation der Bandscheibe in den Zwischenwirbelköperspalt eingesetzt. Die Variationen in der Lokalisation ergaben sich abhängig vom Zugang zur Wirbelsäule, der während des Versuches je nach Größe des Tieres, bzw. Leichtigkeit des chirurgischen Zugangs jeweils unbeabsichtigt verändert werden musste. Die Lokalisationen der verschiedenen Implantate in den Schafen wurden nach einem block randomisierten Schema vorgenommen, so dass eine gleichmäßige Verteilung entstand. Das Schaf Nr. 2 wurde wegen akuten Auftretens einer Paraparese euthanasiert und erscheint deshalb nicht im Verteilungsschema (Tab. 1).

2.5 Vorbereitung

Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Schweizerischen Tierschutzgesetzes (TSG, Art 12-19b) für die Durchführung von Tierversuchen ausgeführt und wurden zuvor von den lokalen, kantonalen Veterinärbehörden genehmigt (Bew.Nr. 23/2007).

Die verwendeten adulten Schafe stammen aus der Zucht der MSRU, Universität Zürich, die nachweislich Maedi-Visna frei ist, und wurden bis 14 Tage vor dem Versuch in Herden, zumeist im Freien, gehalten. Die Schafe wurden im Rahmen der regelmäßigen Herdenkontrollen alle 12 Monate mit Heptavac P (Ovilis[®], Intervet, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) zum Schutz vor Clostridien- und

Pasteurelleninfektionen geimpft und mit Doramectin (Dectomax[®], Pfizer, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) und Netobimin (Hapadex[®] ad us. vet., orale Suspension 5%, Essex Tierarznei, Provet AG, Lyssach, Schweiz) alle 3 Monate antiparasitär behandelt, sowie einer Klauenpflege unterzogen. Die Schafe sind standardmäßig mit betriebseigenen Ohrmarken zusätzlich zur TVD-Marke gekennzeichnet. Die Tiere wurden 14 Tage vor der Operation nochmals entwurmt und in einen Stall am Tierspital Zürich verbracht, um sich einzugewöhnen. Eine Woche vor der Operation erfolgte eine chemische und hämatologische Blutuntersuchung. Drei bis vier Tage vor der Operation wurden die Schafe gewogen, das Operationsfeld sowie eine Halsseite geschoren und die Klauen nochmals kontrolliert. Die Schafe wurden auf Sägespäne gestellt und das Futter wurde ihnen für 24 Stunden vor der Operation entzogen, wobei sie freien Zugang zu Wasser hatten. Am Tag vor der Operation erfolgte eine klinische Untersuchung.

2.6 Operation

Kadaverversuche: Um optimale Ergebnisse zu erzielen, wurden die Implantate vor der ersten Operation an einem Wirbelsäulenpräparat getestet. Dabei wurde die Größe und Form in Relation zum Zwischenwirbelkörperspalt beurteilt und radiologische Aufnahmen in zwei Ebenen gemacht. Bei einer Operation an einem toten Schaf wurde der chirurgische Zugang simuliert.

Hauptversuche: Vor der Operation wurde die bestandseigene Ohrmarke des Schafes durch eine projektbezogene nummerierte Ohrmarke ausgetauscht (3751 bis 3759) und das Tier mit einem Mikrochip (DATAMARS SA, RF-Identification Technology, Bedano-Lugano, Schweiz) subkutan auf der linken Halsseite gekennzeichnet.

Die Schafe wurden mit Xylazin (0,1 mg/kg i.m.; Rompun[®]; Bayer, Vertrieb Provet AG, Lyssach, Schweiz) prämediziert und nach circa 30 Minuten in den Vorbereitungsraum geführt. Nach aseptischer Präparation der linken Halsseite wurde ein Venenverweilkatheter (Vygonüle S[®] 14G; Vygon GmbH; Aachen, Deutschland) gelegt und eine präoperative antibiotische und antiphlogistische Medikation mit Benzylpenicillin (30000 I.U./kg; Penicillin Natrium Streuli ad us.vet.[®], G.Streuli & Co. AG, Uznach, Schweiz), Gentamycin (4mg/kg; Vetagent[®]; Intervet, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) und Carprofen (4 mg/kg Rimadyl[®], Pfizer, Vertrieb Dr.Gräub AG, Bern, Schweiz) i.v. verabreicht, sowie 3000 I.U. Tetanusserum (Tetanus-Serum Intervet ad us.vet.[®]; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) s.c. injiziert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit i.v. Applikation von Ketamin (2mg/kg; Narketan[®], Vetoquinol AG, Belp-

Bern, Schweiz) und Diazepam (0,1mg/kg i.v.; Valium[®]; Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz). Je nach Bedarf wurde Propofol (2-4mg/kg Propofol[®]-Lipuro; 1% Glasampullen von B. Braun Melsungen AG, Deutschland) i.v. gegeben und nach Ablegen der Tiere der Kehlkopf mit Lidocain Spray (entsprechend ca. 10 mg, Xylocain[®] Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz) betäubt, um die Intubation mit einem Endotrachealtubus der Größe 10-12 zu ermöglichen. Auf dem Operationstisch wurde die Narkose als Inhalationsnarkose mit 1-1,5% Isofluran (Forene[®]; Abbot AG, Baar, Schweiz) und einer Dauertropfinfusion Ringer-Laktat (10 ml/kg/h; Infusionslösung) mit Ketamin (0,6mg/kg/h Narketan[®] i.v.) und Lidocain (anfangs 0,8 mg/kg Bolus über 20 Minuten danach 26 µg/kg/h in DTI; Lidocain Streuli[®] 2% ; Streuli Pharma AG, Uznach, Schweiz) weitergeführt. Fentanyl (10 µg/kg/h; Fentanyl Janssen[®]; Janssen Cilag AG, Baar, Schweiz) wurde mit einer separaten Spritzenpumpe i.v. zur Vervollständigung der Analgesie verabreicht. Bei zwei Schafen wurde während der Operation entschieden, das Muskelrelaxans Pancuronium (0,1mg/kg Pavulon[®] Organon Teknika, Eppelheim, Deutschland) als einfache Dosis intravenös zu verabreichen, um Bauch- und Lendenmuskulatur zu entspannen.

Das Schaf wurde dorsal mit einem Winkel von 30° zur rechten Seite gelagert, so dass die linke Flanke für den geplanten Zugang gut zu erreichen war. Etwa 30 Minuten vor Ende der Operation wurde die Ketamin- und Fentanyl-Infusion gestoppt und Buprenorphin (0,01 mg/kg Temgesic[®]; Essex Chemie AG, Luzern Schweiz) i.m. appliziert, um eine optimale Analgesie zu erreichen.

Nach standardmäßiger aseptischer Vorbereitung des Operationsfeldes mit Hibiscrub[®] (SSL Healthcare Schweiz AG, Pratteln, Schweiz), 70% Alkohol und Hibitane[®] (G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) wurde ein etwa 20 cm langer Hautschnitt mit einem Skalpell vom dorsalen Ursprung der letzten Rippe zur Kniefalte in der linken Flanke gesetzt. Dabei wurde auch der Hautmuskel M. cutaneus trunci durchtrennt. Das subkutane Fettgewebe, der M. obliquus externus abdominis, M. obliquus internus abdominis und M. transversus abdominis wurden mit Hilfe eines Elektrokauters (Berchtold Elektrotom 80, Vertrieb Hausmann, St. Gallen, Schweiz) durchtrennt und Blutungen gestillt. Die Chirurgen benutzten für den weiteren Zugang zur Wirbelsäule einen SynFrame (Synthes, Oberdorf, Schweiz). Dieser schafft mit seinen Langenbeck ähnlichen Retraktoren, den sogenannten Blades, und einer zusätzlichen fiberoptischen Lichtquelle, die direkt am Rahmen des Systems eingeführt wird, optimale Bedingungen für den tiefen Zugang zur Lendenwirbelsäule. Die

anatomische Tiefe des Zugangs erforderte eine Verlängerung einiger Instrumente, welche in einem lokalen Werkzeugshop (C. Schaller, Bern, Schweiz) bei den Langenbeck und Hohmann Retraktoren durchgeführt wurde und die daraufhin ein komplikationsfreies Arbeiten ermöglichte. Das unter den Bauchmuskeln liegende Peritoneum samt Fascia transversalis wurde vorsichtig abpräpariert, wodurch dorsal der retroperitoneale Raum zum Vorschein kam, in dem der M. quadratus lumborum und M. psoas major, die Aorta, weitere Blut- und Lymphgefäße und die Lendennerve liegen. Die Wirbelkörper der Lendenwirbel 6, 5, 4 und 3 wurden von kaudal herkommend vom M. psoas major getrennt und mit Hilfe der Langenbeck Retraktoren freigelegt. Zunächst wurde dann der kaudale Zwischenwirbelkörperspalt (L5/6 bei Nr. 3751, 3758 und 3759, L4/5 bei Nr. 3753, 3754, 3755, 3756, 3757) lokalisiert und die Muskeln und andere Weichteile mit Hilfe von Hohmann Knochenhebeln, welche mit der Spitze vorsichtig in einen Wirbelkörper eingeschlagen wurden, vom Operationssitus retrahiert. Die feinen Blutgefäße, welche über den Zwischenwirbelspalt verliefen, wurden mit dem Elektroauter koaguliert, um jegliche Blutung und Verschleierung des Operationsfeldes zu vermeiden. Mit einer Skalpellklinge 15 wurde der Anulus fibrosus direkt an den Enden der Wirbelkörper tief eingeschnitten, und dann die gesamte Bandscheibe mit Hilfe eines Cobb (Synthes, Oberdorf, Switzerland, modifiziert durch Orthopaedic Research Lab, McGill University, Montreal, Canada) direkt von den Wirbelkörperendplatten gelöst und herausgenommen. Der Zwischenwirbelspalt wurde mit Hilfe eines Caspar Retraktors (Synthes, Oberdorf, Schweiz) erweitert und so für die chirurgischen Instrumente zugänglich gemacht. Dafür wurden spezielle Schrauben in die beiden Wirbelkörper eingebohrt, die Schrauben miteinander verbunden und die beiden Wirbelkörper mit Hilfe einer Zahnstange auseinandergedrückt. Mit geraden und gebogenen Rongeurs, Curetten und Knochenstanzen wurden die Bandscheibenreste vorsichtig aus dem Zwischenwirbelkörperspalt entfernt. Nach dem Debridement wurde der Gelenkraum daraufhin mit speziell dafür angefertigten Raspeln (C.Schaller, Bern, Schweiz) bearbeitet, die einer flacheren Implantatform entsprechen. Diese Raspeln wurden in aufsteigender Dicke angewandt bis jeglicher Faserknorpel entfernt und blutendes Knochengewebe zu sehen war. Daraufhin wurde das Implantat in einem Winkel nach Protokoll senkrecht zur Querachse des Zwischenwirbelspaltaltes eingesetzt, indem es an einem Metallstiel befestigt eingeführt und mit Hilfe eines Gummihammers nach dorsal vorgeschoben wurde. Es wurde immer zuerst das kaudale Implantat und daraufhin das kraniale Implantat mit derselben Technik unter Sichtkontrolle eingesetzt.

Nach Schließen der Bauchhöhle mit resorbierbarem Faden (Vicryl® 2/0; Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien) folgten zwei verschiedene Muskelnähte (Vicryl® 1/0) und eine fortlaufende Unterhautnaht (Vicryl® 2/0). Die Haut wurde mit Staples (Davis+Geck Appose ULC®; Vertrieb B.Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Über die Operationswunde wurde mit Staples eine sterile Gaze zum Schutz vor direkter Verschmutzung befestigt. Noch in der Narkose wurden mit dem C-Bogen jeweils eine laterolaterale und eine ventrodorsale radiologische Aufnahme vorgenommen (Abb. 8 und 9).

Zum Erwachen aus der Narkose wurden die Schafe auf einer sauberen Unterlage platziert, extubiert und in der Aufwachphase intensiv betreut und beobachtet. Sie blieben nach der Operation zu zweit oder dritt etwa 48 Stunden in einer mit Sägespänen eingestreuten Box, wurden mit Heu gefüttert und hatten freien Zugang zu Wasser. Sie erhielten als Analgesie nach der ersten i.m. Applikation von Buprenorhin (0,015 mg/kg) noch in Narkose zwei weitere i.m. Injektionen in vierstündigem und danach drei weitere in achtsündigem Abstand. Die Entfernung des Gazetupfers erfolgte nach drei, die der Staples durchschnittlich nach vierzehn Tagen. Für einen Monat post Op wurden die Schafe in Dreier-Gruppen in einem mit Stroh eingestreuten Stall untergebracht. Für die zwei folgenden Monate bis zur Schlachtung wurden die Schafe nochmals umgestellt und hatten Weidegang. Während der Zeit zwischen der Operation und der Schlachtung wurden die Tiere täglich von Fachpersonal auf Wohlbefinden, Schmerzzeichen und neurologische Symptome untersucht.

2.7 Probengewinnung und Aufbereitung

Nach 3 Monaten wurden die Schafe durch Blutentzug in Narkose getötet. Um eine optimale Fixation der Lendenwirbelsäule zu erreichen, wurde eine besondere Perfusionsmethode über das Blutgefäßsystem durchgeführt.

Dem Schaf wurde zunächst Ketamin (10mg/kg Narketan®; Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) mit Xylazin (0,6mg/kg Rompun® 2% ad us. vet., Injektionslösung, Provet AG, Bayer Health Care) und Atropin (1 ml der 1 ‰ Lösung) in einer Mischspritze i.m. verabreicht. Nach 10 bis 20 Minuten legten sich die Tiere nieder und in linker Seitenlage wurde in die Vena saphena parva ein Verweilkatheter eingeführt, über den zunächst 20.000 IU Heparin i.v. injiziert wurden. Nach einigen Minuten wurden die Tiere mit Pentothal 5% (Pentothal® 5 mg Injektionslösung, Ospedalia AG) nach Wirkung tief narkotisiert und die Arteria carotis communis der rechten Halsseite

freigelegt, vom Nervus vagus getrennt, markiert und eröffnet. Nach einigen Minuten führte das Ausbluten zum Atemstillstand, gefolgt von Herzstillstand und Tod. In die Arteria carotis wurde ein großlumiger Katheter eingeführt. Das Schaf wurde dann an drei Haken in annähernd natürlicher, stehender Position aufgehängt und es wurden über den Katheter wurden circa 15 Liter Glutar-Formaldehydgemisch mit einer Pumpe und einem Druck von 1 bar in das Gefäßsystem gepumpt. Das Fixationsgemisch bestand aus 2,5% Glutaraldehyd und 1,3% Formaldehyd in einem Natrium-Kaliumphosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,2). Zusätzlich enthielt das Gemisch Calcium- und Magnesiumionen; pro Liter Lösung wurden 37 mg Calciumchlorid-dihydrat (250µMol) und 101 mg Magnesiumchlorid-hexahydrat (500µMol) zugesetzt.

Der fixierte Körper verblieb 24 Stunden in stehender Position. Daraufhin wurde die Lendenwirbelsäule herausgetrennt und freipräpariert. Die Muskulatur wurde weitgehend vom Knochen entfernt und die Wirbelsegmente adspektorisch untersucht sowie photographiert (Abb. 10). Mit dem Faxitron (Faxitron X-Ray System, Hewlett&Packard, Kodak X-OMAT MA Film, Kodak, Frankreich) wurden Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen angefertigt und die Implantatlokalisierung markiert.

Das die Implantate beinhaltende Segment der Lendenwirbelsäule wurde mit einer Bandsäge (Stryker® Instruments, Michigan, USA) großzügig herausgetrennt und anhand der Schafnummer, der Position und der Art des Implantates benannt und in dem oben genannten Gemisch aus Glutar- und Formaldehyd aufbewahrt. Die grob zugeschnittenen Implantatproben wurden mit dem C-Bogen auf ihre Implantatlokalisationen untersucht und das Gewindeloch mit einer Nadel lokalisiert (Abb. 4). Mit Hilfe eines Dremel Bohrers und einer Luerzange wurde das Gewindeloch unter dem entstandenen Bindegewebe freigelegt und gesäubert. Nun konnte die Probe mit einer Schraube in eine maßgefertigte Sägehalterung mittels ihres Gewindes und der Justierkerbe eingespannt werden. Die Sägehalterung spannte das Implantat so auf, dass exakt auf die Abmessungen zugeschnitten werden konnte, die für die endgültige Fixationshalterung, welche später in ein Glas eingesetzt wurde, notwendig und maximal möglich waren (Abb. 5 und 11). Die Proben wurden mit montierter Sägehalterung mit dem Faxitron in zwei Ebenen geröntgt (Abb. 12 und 13).

Die endgültige Fixationshalterung aus Aluminium wurde entworfen (C. Schaller, Bern, Schweiz), um eine für die Auswertung optimale Einbettung des Implantates in einer definierten Position zu ermöglichen. Das Implantat konnte mit Hilfe seines Schraubengewindes und der Justierkerbe auch in diese Halterung in aufrechter,

unveränderlicher Position eingespannt werden. Die Fixationshalterung konnte später mit ihrem Fuß direkt in der Innenlochsäge befestigt werden, so dass eine exakte Ausrichtung des Implantates im Plastikblock möglich war (Abb. 3).

Die erhaltenen Probenstücke wurden in 75 ml Gläsern für einen Zeitraum von 7 Tagen in 4% Formaldehydlösung aufbewahrt und daraufhin für weitere 7 Tage in 40% Alkohol gelagert. Innerhalb dieser Zeit wurde der Alkohol einmal gewechselt, um eventuelle Geweberückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40% bis 100%) innerhalb von 10 Tagen dehydriert. Während der letzten Schritte der Entwässerung wurden die Proben auf die Aluminium-Fixationshalterung aufgeschraubt, die passend in die Probengläser eingesetzt werden konnte. Die rechte Implantatseite wurde nach oben eingespannt, entsprechend die linke nach unten zum Fuß der Halterung. Es folgten 7 Tage in Xylol und 7 Tage in flüssigem Polymethylmethacrylat (PMMA) unter Vakuum bei 4 Grad Celsius. Der Fuß der Fixationshalterung wurde nun nach oben ausgerichtet, so dass er aus dem flüssigen PMMA herausragte und später in die Innenlochsäge eingespannt werden konnte. Im Anschluss wurden die Gläser bei normalem Atmosphärendruck verschraubt und zum Aushärten circa 3 Wochen im Kühlschrank, einige Tage im Wasserbad und abschließend einige weitere Tage im Wärmeschrank aufbewahrt.

Die Probengläser wurden vom ausgehärteten PMMA abgeschlagen und der Block mit einer Bandsäge (Stryker[®] Instruments, Michigan, USA) grob zugesägt. Die Dickschnitte wurden mit einer Innenlochsäge (Leica[®] SP1600, Leica Instruments GmbH, Germany) und einem speziell angefertigten Schlitten (C. Schaller, Bern, Schweiz) gesägt, auf den der Fuß der Fixationshalterung mit Implantat aufgeschraubt wurde, der eine exakte Justierung zuließ. Aufgrund der Hohlräume, die durch die runden Lochreihen in drei verschiedenen Ebenen zustande kamen, ergab sich je nach Schnittebene ein unterschiedliches Bild mit Querstreifen, kleinen Rechtecken, Quadraten oder Längsstreifen (Abb. 14 und 15). Der Ablauf dieser Schnittbilder wiederholte sich alle 1,2 mm im Implantat und wurde unterbrochen durch den massiven Mittelsteg, der das Gewindeloch beinhaltet. Es wurden endgültige Schnitte in der sichtbaren Ebene der Zacken (Abb. 14) und der Quadrate (Abb. 15) angestrebt, anhand derer man das Anwachs- und Einwachsverhalten des Knochens in und an das Implantat am besten beurteilen konnte. Dazu wurden die Dickschnitte vorerst 100-200 µm über dieser Ebene geschnitten, gepresst und mit Kunststoffkleber (Cementit[®] CA 12, Merz +

Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf Akropalobjektträger (Pespex GS 3 mm, Wachendorf Ag Technische Industrieprodukte, Basel, Schweiz) geklebt. Die Implantatquerschnitte wurden dann mit der Schleifmaschine (Struers® Planopol-V, Merck) mit 1200 körnigem Schleifpapier per Hand und Sichtkontrolle abgeschliffen bis die gewünschte Ebene sichtbar wurde. Durchschnittlich betrug die Dicke der Schnitte nach dem groben Schleifen etwa 500 µm. Daraufhin wurden die Schnitte mit 4000 körnigem Schleifpapier poliert.

Pro Implantat wurden zwei Dickschnitte der Zackenebene (Abb. 14) und zwei Dickschnitte der Quadratebene (Abb. 15) angefertigt und diese mit Toluidinblau angefärbt. Mit einem Makroskop (Leica M 420®, Leica-microsystems, Glattpburg, Schweiz), einer digitalen Kamera (Leica DC 200®) und der Software Leica IM 1000® wurden die Dickschnitte in der Vergrößerung mit dem Fünfer-Objektiv fotografiert und digital gespeichert. Anhand dieser Bilder erfolgte die semiquantitative und quantitative Auswertung der Osseointegration des Implantates (Abb. 16 und 17).

2.8 Auswertung

2.8.1 Radiologie

Post Op, C-Bogen: direkt nach dem chirurgischen Eingriff wurde noch in Narkose eine laterolaterale Aufnahme und eine ventrodorsale Aufnahme mit dem Fluoroskop (C-Bogen) gemacht. Diese Aufnahmen bestätigen die korrekte Position der Implantate im Zwischenwirbelspalt (Abb. 8 und 9).

Post mortem: die laterolaterale und ventrodorsale Aufnahme der Lendenwirbelsäule direkt nach deren Entnahme diente der Lokalisation und der Beurteilung der Position und einer eventuellen Veränderung der Position der Implantate. Weiterhin konnten Knochenzubildungen um die Implantate grob beurteilt werden.

Halterung-Faxitron: die genauere Beurteilung der Knochenzubildungen um das Implantat und die genaue Position und der Grad der Winkelung im Zwischenwirbelspalt konnte an den laterolateralen und kraniokaudalen Aufnahmen mit dem Faxitron (Faxitron X-Ray System, Hewlett&Packard, Kodak X-OMAT MA Film, Kodak, Frankreich) erfolgen. Jedes einzelne Implantat wurde hier bezüglich sich selbst in exakt kraniokaudaler und laterolateraler Richtung radiologisch abgebildet (Abb. 12 und 13).

-Der Winkel, der durch das Schräge Einsetzen der Implantate zustande kam, wurde ausgemessen und als „Abweichung von 90°“ bezeichnet.

-Die periphere Ossifikationsneigung wurde mit 0(-) = wenig Ossifikation, 1(+) = mässige Ossifikation und 2(++)= starke Ossifikation beurteilt.

-Das ventrale Überstehen des Implantates wurde mit 0(-) = kein Überstehen, 1(+) = ein Überstehen bis zu 1mm und 2(++)= ein Überstehen bis 2mm, beurteilt.

(Tab.2)

2.8.2 Qualitative Beurteilung

Eine nur qualitative Beurteilung der unterschiedlichen Zellen der Matrices erfolgte durch Aufnahmen in Vergrößerungen mit Objektiven der Größen 1,25x bis 20x. Betrachtet wurde sowohl der gesamte Innenraum der Implantate als auch die Kontaktzone an der äußeren Oberfläche. Besondere Aufmerksamkeit wurde den Bereichen gewidmet, die sowohl für die qualitative als auch für die semiquantitative Auswertung definiert waren (Abb. 23 und 24). Für die spätere semiquantitative Beurteilung der Gewebearten wurden hier die Zellen, soweit bei einem Dickschnitt möglich, differenziert, nicht zelluläre Bestandteile identifiziert und in vier verschiedene Gewebearten eingeteilt.

2.8.3 Quantitative Beurteilung

Es wurden sechs Dickschnitte der linken Seite des Implantates angefertigt, da diese generell umfänglicher im Zwischenwirbelspalt positioniert war. Wie in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt, ist die linke Seite des Implantates in der Fixationshalterung nach unten ausgerichtet. Ausgehend vom Steg wurden die sechs Dickschnitte in den Ebenen 40,3; 39,7; 38,8 ; 37,9 ; 37,3 ; 36,4 angefertigt. Die Zahlen entsprechen Millimeterangaben vom Abstand der Ebene zum Fuß der Einspannung, werden aber in der Folge dimensionslos verwendet. Es handelt sich um zwei verschiedene Schnittebenenbilder (Abb. 14 und 15), die Zacken-Ebene und die Quadrat-Ebene. Die zwei Zacken-Ebenen, nämlich 38,8 und 36,4 sind in Abbildung Nr. 19 dunkel rot gekennzeichnet. Sie sind die Schnitte anhand derer der Anwachsquotient errechnet wurde.

Für die semiquantitativen Auswertungen wurde nur zwei Ebenen der Zacken genutzt, um das Anwachsverhalten des neuen Knochens an die Implantatoberfläche zu beurteilen. Dazu wurden sie mittels eines Makroskops mit aufgesetzter Digitalkamera (Leica® M420, Leicamicrosystems, Glattbrugg, Schweiz) in der Vergrößerung mit einem 1,0 x 0,5 Objektiv als Übersichtsaufnahme in den Computer eingelesen. Der in die Zacken des Implantates eingewachsene Knochen wurde semiquantitativ beurteilt

und ein Quotient errechnet, der die Anwachsrate widerspiegelt. Beachtet wurde dabei auch das Herausstehen des Implantates aus dem Zwischenwirbelspalt.

Der Anwachsquotient wurde folgendermaßen errechnet: Die Messungen wurden an jeweils zwei Zackenschnitten desselben Implantates durchgeführt. In einem definierten Bereich (Abb. 20) wurden die mit Knochen zugewachsenen Zackeneinziehungen am oberen und unteren Implantatrand ausgezählt und mit der totalen Anzahl der Zacken ein Quotient errechnet. Es wurden jeweils nur die vorderen fünf Zacken beurteilt, die zwischen den Wirbelkörperendplatten lagen und nicht der Teil, der bei einigen Implantaten ventral hervorstand. Die Gesamtzahl der ausgezählten Zacken war folglich immer 10. Ein unvollständiges Einwachsen wurde als 0.5 gewertet, ein totales als 1, kein Einwachsen über die Verbindungslinie beider Zackenspitzen als 0. Der Quotient (Zugewachsene Zacken / Gesamtzahl der ausgezählten Zacken) wurde für alle Präparate von zwei unabhängigen Personen in wiederholten Berechnungen ermittelt.

Der Anwachsquotient repräsentiert das Anwachsverhalten des Knochens an das Implantat (siehe Abb. 22).

2.8.4 Statistik

Aufgrund der niedrigen Tierzahl wurde auf eine statistische Auswertung der Versuchsgruppen verzichtet. Vielmehr wurden die Ergebnisse als Rohdaten auf Skalen geplottet, um eine visuelle Beurteilung zu vereinfachen. Lediglich die positiven und negativen Korrelationen wurden mit dem Programm SPSS 13.0 für Macintosh X10 errechnet und p-Werte $< 0,05$ (bzw. mit der Bonferoni Korrektur p- Werte $< 0,0025$) als statistisch signifikant angesehen.

3 Resultate

3.1 Operation und postoperative Phase

Kadaverversuche: Es stellte sich heraus, dass ein Teil der zur Verfügung stehenden Instrumente für den retroperitonealen Zugang nicht lang genug waren. Die Instrumente wurden kurzfristig verlängert und die Operation konnte daraufhin komplikationslos ablaufen.

Hauptversuche: Die Gesamtzeit der Operation betrug zwischen 2 und 4 Stunden. Bei 8 von 9 Schafen verlief die Operation erfolgreich. Der anteriore Zugang gestaltete sich durch die Interferenz mit dem Pansen, die Tiefe des Operations-Situs und eine

mangelnde Muskelentspannung als schwierig. Aus diesen Gründen wurde bei zwei Schafen intraoperativ das Muskelrelaxans Pancuronium als Einzeldosis intravenös verabreicht. Diese Praxis wurde aber danach wieder eingestellt, da sich keine nennenswerte Verbesserung ergab. Anfänglich betrug die Operationszeit zwischen 3-4 Stunden, jedoch konnte die durchschnittliche Operationszeit mit zunehmender Übung schon bald auf circa 2 Stunden verringert werden. Aufgrund der langen Dauer der Operation war die Aufwachphase bei einigen Schafen verlängert und die Schafe brauchten mehrere Versuche bis zum sicheren Stehen. Es war ursprünglich vorgesehen, die Implantate mit einem unbehandelten Level Abstand in die Zwischenwirbelkörperspalten L3/4 und L5/L6 einzusetzen. Infolge des erschwerten Zugangs musste davon in allen Fällen abgesehen werden, so dass die Implantation ohne diesen Abstand bei L3/4 und L4/5 oder bei L4/5 und L5/6 vorgenommen wurde.

Das Einbringen und korrekte Positionieren der Implantate war aufgrund der Lokalisation und des mit einem ca. 20% Schrägwinkel zur Wirbelsäule gelegenen Zugangs schwierig. Dazu kam, dass der Haltestab während des Einbringens genau in der ventralen Mitte des Implantates angebracht war und ein antegrades Einbringen infolge der anatomischen Position des Pansens nicht exakt erfolgen konnte. Es konnte keine optimale Positionierung erreicht werden und die Implantate waren aus diesem Grund mit einem systematischen Fehler zwischen 5-35° rotiert nach links zu der Sagittalebene inseriert und zur Seite des Operationszugangs hin leicht überstehend.

Bei Schaf Nr. 2 trat eine Paralyse der Hintergliedmassen und der Blasenfunktion auf. Das Tier musste einen Tag post OP euthanasiert werden. Bei der pathologischen Untersuchung ergaben sich folgende Befunde: Im Zentralkanal befand sich eine reiskorngroße Menge an Bandscheibenmaterial, die histologische Untersuchung des Rückenmarkes zeigte eine beginnende Malazie mit degenerierenden Neuronen und eine mittelgradige Leptomeningitis. Weiterhin war im Abdomen eine hochgradige, fokal extensive, fibrinöse und exsudative Peritonitis sichtbar, die von einer retroperitonealen Verletzung des Peritoneums in Wirbelsäulennähe ausging und bei dem chirurgischen Eingriff entstanden war.

Nach Analyse der Komplikationen, die zum Verlust des Versuchstieres geführt hatten, wurde eine zweite Kadaverstudie durchgeführt und eine Veränderung des operativen Zugangs vorgenommen, wonach keine weiteren schwerwiegenden Komplikationen auftraten. Schaf Nr. 5 zeigte neurologische Ausfälle am linken Hinterbein, negative Propriozeption und positive Sensibilität. Vermutlich wurde

während der Operation der N. femoralis (5. Lendennerv) verletzt, was sich in einer Atrophie des M. femoralis äußerte. Die distale linke Hintergliedmaße wurde während des gesamten Versuchs mit Verbänden geschützt. Die Symptome verbesserten sich langsam, so dass nach zwei Monaten wieder eine verzögerte Propriozeption zu sehen war. Das Schaf konnte jedoch für die Auswertung genutzt werden, da keine Störung des Allgemeinbefindens vorlag und ein normales Knochenwachstum an der operierten Wirbelsäule zu erwarten war.

Die nach links rotierte Positionierung der Implantate führte bei den anderen Versuchstieren weder zu neurologischen Symptomen noch zu anderen Komplikationen. Die Operationswunden, die mit Staples verschlossen wurden, zeigten keine Irritationen. Bei zwei Schafen trat jedoch ein etwa 15x15 cm großes Serom unter der Naht auf. Dieses wurde punktiert und war zwei Wochen post OP nahezu vollständig resorbiert. Die Schlachtung konnte bei allen Tieren zum vorgesehenen Zeitpunkt von drei Monaten post Op durchgeführt werden.

3.2 Makroskopische Beurteilung

Die nach der Euthanasie entnommenen Lendenwirbelsäulen zeigten im Bereich der Zwischenwirbelimplantate deutliche, jedoch unterschiedlich stark ausgeprägte Umfangsvermehrungen. Diese bezogen sich auf den Zwischenwirbelkörperbereich und die beiden anliegenden Wirbelkörper und breiteten sich nicht auf anliegende Strukturen aus. Die umgebende Muskulatur, die sich physiologisch in Form, Farbe und Struktur zeigte, wurde entfernt. Die Fotografien der Wirbelsäulensegmente wurden zur Dokumentation gespeichert aber nicht weiter ausgewertet (Abb. 10).

3.3 Radiologische Beurteilung

Post Op – C-Bogen: Anhand der Post Op Aufnahmen wurde die korrekte Position der Implantate beurteilt. Alle Implantate befanden sich von links eingeschoben im Zwischenwirbelkörperspalt. Bei einigen Implantaten konnte man ein Überstehen von bis zu 2 mm nach ventral sehen. Schaf Nr. 2 zeigte radiologisch ein sehr weit dorsal vorgeschobenes Implantat, was auch bei der späteren Sektion bestätigt werden konnte und retrospektiv als Ursache für den Vorfall von Bandscheibenmaterial angesehen wurde.

Post mortem-Röntgenaufnahmen: Die korrekte Position der Implantate konnte auf diesen radiologischen Aufnahmen kontrolliert und kein augenscheinliches Verrutschen der Implantate über die gesamte Implantationszeit festgestellt werden. Um die Spine

Cages zeigte sich, ventral am stärksten ausgeprägt, ein Kallus. Dieser war jedoch bei den verschiedenen Schafen sehr unterschiedlich stark ausgebildet. Auch zeigte sich, dass die Schafe keine einheitliche Lendenwirbelanzahl hatten. Sie besaßen entweder 6 oder 7 Lendenwirbel (Tab. 2).

Faxitron-Röntgenaufnahmen: Die Faxitron Aufnahmen in der Halterung zeigten die unterschiedlich starke Ossifikationen um das Implantat sehr deutlich, sowie ein unterschiedlich starkes ventrales Überstehen des Implantates sowohl in der anterioposterioren und als auch in der seitlichen Aufnahme. Die durch das Einschieben von der linken Seite hervorgerufene Schrägstellung des Implantates, konnte am besten anhand der kraniokaudalen Aufnahme beurteilt werden (Abb. 12). Die Schrägstellung ist in der Tabelle 2 als Abweichung von der 90° Achse beschrieben. Weiterhin konnte ein leichtes Einsinken der Implantate in die Endplatten der Wirbelkörper beobachtet werden (Abb. 13).

3.4 Histologische Beurteilung

3.4.1 Qualitative Beurteilung

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Gewebe im Bereich des Implantates durch Aufnahmen in den Vergrößerungen von 1,25er Objektiv bis 20er Objektiv wurde bei allen Implantaten ein ähnlicher Aufbau von Geweben festgestellt (Abb. 16 und 17). Kranial und kaudal des Implantates waren die angrenzenden knöchernen Wirbelkörper sichtbar. Angrenzend zum Implantat befanden sich in der Knochenstruktur Anzeichen von Ausbildung neues Geflechtknochens sowie neuer Havers'scher Systeme. Ventral des Implantates bildete sich bei circa 80 % der Implantate ein Kallus aus, der nur bei einem Implantat eine im Dickschnitt sichtbare komplette Überbrückung zwischen den beiden Wirbelkörpern formte. Die Kallusformation war unabhängig von der Beschichtung des Implantates.

Der neue dunkelblau angefärbte Geflechtknochen mit sichtbarer Knochenumwandlung stand bei nahezu allen Implantaten an mindestens einer Lokalisation in Kontakt zum Implantat. Die Ausnahme war eines der KollagenI/Chondroitinsulfat beschichteten Implantate mit einem Anwachsquotient von 0. Dieses Implantat war vollkommen mit Bindegewebe umschlossen. Bei direktem Knochen-Implantat Kontakt wuchs der Knochen von außen in die Zacken an die Implantatoberfläche des Spine Cages ein. Dies geschah innerhalb eines Implantates unregelmäßig, so dass kein Implantat vollkommen eingewachsen war. Bei

inkomplettem Anwachsen blieb die letzte Ecke der Zacke mit Knorpel oder Bindegewebe gefüllt, welches an dieser Lokalisation in gleichen Teilen auftrat. Nur bei wenigen Implantaten, vermehrt bei den mit Bisphosphonat beschichteten, konnte auch im Inneren der Spine Cages ein Einwachsen von Knochengewebe festgestellt werden. Bei den übrigen Implantaten konnte histologisch kein Unterschied in Bezug auf das Vorhandensein einer Beschichtung ausgemacht werden.

An der ventralen Oberfläche der Implantate war bei vielen Implantaten eine bindegewebige Einbettung zu beobachten. Auch im Inneren der Implantate fiel ein überwiegender Anteil (mehr als 50%) von Bindegewebe mit reifen Fibrozyten und Blutgefäßen auf. Im und um das Implantat fanden sich in Kontakt mit Bindegewebe Chondrozyten-ähnliche Zellen, die in eine proteoglykanhaltige Matrix gebettet waren und als hyaliner Knorpel klassifiziert wurden. Dieser trat bei allen Implantaten mit großen Bindegewebsflächen verstreut in Inseln auf. Bei Implantaten mit weniger Bindegewebe stand der Knorpel eher in Kontakt mit Knochengewebe. Im dorsalen Bereich über dem Implantat war bei allen Präparaten ein Rest des Faserknorpels der Bandscheibe sichtbar. Dieser wurde bei allen Implantaten geringgradig in den dorsalen Innenraum des Implantates hineingedrückt.

Die weitere Füllung des Innenraumes bestand aus einem Gemisch aus Knochensplintern und Knochenmehl, das in unserer Untersuchung als Debris bezeichnet wurde. Als Knochen wurde dieser Anteil von stark blau angefärbtem Material nur ausgewertet, wenn deutliche Osteone sichtbar waren. Der Debris war besonders stark in den unbeschichteten Implantaten enthalten und war auch in geringerem Maß in den mit Bisphosphonat beschichteten Implantaten festzustellen. Die mit Kollagen beschichteten Implantate wiesen keine Füllung mit Knochendebris auf, sondern waren mehrheitlich nur mit Bindegewebe gefüllt.

3.4.2 Quantitative Beurteilung

Die Qualität der Dickschnitte war gut und die Darstellung der Ebenen in Relation zum Implantat konnte technisch exakt durchgeführt werden. Die Ebenen im Implantat konnten durch Schleifen per Hand und mit visueller Kontrolle erreicht werden und lieferten ein Schnittbild, das eine einheitliche Auswertung möglich machte.

Die anhand der Zacken-Ebene berechneten Anwachsquotienten sind in der Abbildung 22 dargestellt. Die Grafik stellt die Werte der zwei Schnittebenen nebeneinander dar, die pro Implantat angefertigt wurden. Dabei handelt es sich um die

Ebene 38,8, die mehr mittig liegt, und die Ebene 36,4, die weiter am linken Rand des Implantates in einem Abstand von 1,2 mm zur ersteren liegt.

Die Anwachsquotienten der 16 Implantate, und somit 32 Dickschnitte, zeigten eine enorm große Variabilität. Sie bewegten sich zwischen Extremwerten von 0 - 90% bei den unbeschichteten Implantaten, zwischen 5 und 85% bei den Bisphosphonat-Implantaten und zwischen 0 und 90% bei den KollagenI/Chondroitinsulfat-Implantaten. Die Mittelwerte waren für die unbeschichteten Implantate am höchsten, gefolgt von der Bisphosphonat- und schließlich der KollagenI/Chondroitinsulfat-Beschichtung. Die zwei Werte der unterschiedlichen Reihen (36,4 und 38,8) desselben Implantates waren nicht immer einheitlich. Dies kann an der Streuung der Werte und dem relativ niedrigen r^2 Wert (0,68 und 0,56) gesehen werden (Abb 21 obere Reihe). Dabei wurde rechts und links oben jeweils die Auswertung unterschiedlicher Prüfer verwendet.

Die Auswertung, die von zwei verschiedenen unabhängigen Prüfern durchgeführt wurde, erwies sich als übereinstimmend mit einem hohen r^2 Wert (0,90 und 0,94) an derselben Schnittebene (Abb. 21 untere Reihe).

Es zeigte sich weiterhin, dass die Schafe oft bei den verschiedenen Implantaten, jeweils eines ohne Beschichtung und ein weiteres mit einer der beiden möglichen Beschichtungen, ähnliche entweder gute oder schlechtere Ergebnisse zeigten. So war bei einem hohen Anwachsquotienten für das unbeschichtete Implantat auch der Wert für das beschichtete Implantat hoch und umgekehrt.

Die leichte Keilform des Implantates bewirkte, dass sich zwischen den Wirbelkörpern eine lordotische Winkelveränderung vollzog. Diese war abhängig von der Einbringung des Implantates und dem Ausmaß des Knorpel- und Knochenabtrags. Der Winkel zwischen den beiden Wirbelkörperendplatten konnte anhand der Wachstumsfugen bestimmt werden. Die Berechnung dieses Winkels ergab keine Relevanz für die Osseointegration und wurde deshalb nicht weiter statistisch ausgewertet.

3.4.3 Semiquantitative Zell-Beurteilung

Die anhand typischer Zellen bestimmten Matrices im Inneren des Implantates sind

1. Knorpelgewebe,
2. Bindegewebe,
3. Knochengewebe,

4. Debris.

Die Beurteilung dieser Zellen im Inneren des Implantates anhand der Zacken-Ebene und der Quadrat- Ebene ergab folgende Resultate, die in der Grafik der Abbildung 25 dargestellt ist. Die Gesamtheit der ausgewerteten Fläche wurde in die vier Gewebearten aufgeteilt und anteilhaft dargestellt.

In den unbeschichteten Implantaten war besonders im dorsalen Teil ein vermehrter Anteil an Debris im Inneren sichtbar. Der Debris zeigte sich vielseitig und beinhaltete sowohl größere Stückchen, wahrscheinlich ursprünglich knöchernen Ursprungs, als auch ganz fein mineralisiertes Knochenmehl, dass man als „milling powder“ bezeichnet. Man konnte nicht genau differenzieren, ob sich das Knochenmehl noch im Abbau befand oder schon eine neue Mineralisation von Bindegewebe stattgefunden hatte. In allen Implantaten war fibröses Bindegewebe der Hauptbestandteil des Implantatinhaltes.

3.5 Statistik

Es zeigte sich lediglich eine negative Korrelation mit einer statistischen Signifikanz von $p < 0,05$ beim Vergleich der Anwachsquotienten mit der Ossifikation ventral des Implantates. Dabei zeigten also Implantate mit viel überbrückendem Kallus eine weniger gute Osseointegration des Implantates und eine vermehrte Bindegewebsbildung im Kontaktbereich mit dem Implantat. Nach einer Bonferoni-Korrektur des p- Wertes und der sich ergebenden Signifikanz von $p < 0,0025$ konnte die oben genannte negative Korrelation nicht bestätigt werden.

4 Diskussion

4.1 Ziel der Studie

In dieser Studie wurde das Ziel verfolgt, ein Spine Cage zu entwickeln, das ohne autologes Knochentransplantat eine optimale Osseointegration erreichen kann und das für eine erfolgreiche Wirbelfusion zum Standardprodukt werden könnte.

Leider konnte die These, dass die Beschichtung eines Spine Cages mit Kollagen/CS oder mit Bisphosphonat die Osseointegration in der Lendenwirbelsäule verbessert, in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigten eine sehr hohe Variabilität, die auf das Einwirken multipler Faktoren auf die Osseointegration eines Zwischenwirbelimplantates schließen lässt. Die Ergebnisse erzielten keine signifikanten

Unterschiede, die Resultate der Anwachsquotienten spiegelten maximal einen Trend wider. Weder die osteoinduktiven Eigenschaften der Kollagen/Chondroitinsulfat-Beschichtung⁶ noch die osteotrope Wirkung von Bisphosphonat⁵⁷ konnten bestätigt werden.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass die unbeschichteten Implantate tendenziell bessere Anwachsquotienten hatten und somit eine bessere Osseointegration als beide beschichteten Implantate aufwiesen. Histologisch betrachtet war innerhalb der Cages hingegen die Infiltration mit Knochenzellen besser bei den mit Bisphosphonat beschichteten Implantaten im Vergleich zu den anderen Implantaten. Im Inneren der unbeschichteten Implantate wurden am meisten Debris (mineralisiertes Knochenmehl) gefunden. Im Gegensatz dazu fand sich bei dem mit Kollagen/CS beschichteten Implantat nur eine minimale Menge an Debris, da wohl dort aufgrund der teilweise kompletten Füllung mit Kollagen-Beschichtungsmaterial wenig Platz für ein Eindringen von Knochendebris vorhanden war, der nach dem Ausraspeln des Zwischenwirbelspaltes und dem Debridement dort verblieben war. Die aufgesprühte Bisphosphonatbeschichtung nahm nur ein mittleres Volumen im Cage ein, so dass sowohl etwas Debris eingedrückt werden konnte, als auch die Beschichtung ihre Wirkung entfalten konnte. Allgemein ist anzunehmen, dass der eingedrückte Debris eine positive Wirkung auf die Füllung des Cages mit Knochenmaterial hatte und die kleinen Knochensplitter die Vorteile eines Knochengrafts im Cage hatten.

Die Tatsache, dass zwischen den beiden nur 2,4 mm auseinander liegenden Schnitten, Ergebnisse mit großer Variabilität auftraten (siehe Abb. 22), lässt darauf schließen, dass die Osseointegration innerhalb eines Cages nicht gleichmäßig aufgetreten ist. Dafür spricht auch die in den Röntgenaufnahmen in der Halterung sichtbare schräge und herausstehende Position des Cages im Zwischenwirbelspalt. Eine komplette Bedeckung des Implantates mit Knochen der Wirbelkörperendplatte war nicht gewährleistet, wodurch das Anwachsen und Einwachsen von Knochengewebe nicht gleichmäßig stattfinden konnte. Dies machte eine einheitliche Auswertung sehr schwierig, würde aber durch eine größere Anzahl von Dickschnitten pro Implantat für die Auswertung weniger relevant. Weiterhin muss davon ausgegangen werden, dass die Implantate sich minimal bewegt haben („micromotion“ und eine ausreichende Stabilität für eine Osseointegration nicht gegeben war. Knochenwachstum toleriert eine maximale Verformung um 2 %, die höchstwahrscheinlich bei vielen Implantaten überschritten wurde⁶⁹.

Die technische Auswertungsmethode war erfolgreich, die Anfertigung der Dickschnitte in Relation zum Cage verlief nahezu problemlos und lieferte sehr gute Ergebnisse. Das Anwachsverhalten des Knochens an die Oberfläche des Implantates konnte anhand der sagittalen Schnitte durch das Implantat und der speziell entwickelten Einbettmethode gut beurteilt werden. So konnte auch eine gute Differenzierung zwischen den Implantaten vorgenommen werden. In der Literatur sind bis jetzt noch keine histologischen Auswertungen von Spine Cages beschrieben⁷⁰.

4.2 Tiermodell

Das Schaf erwies sich als geeignetes Tiermodell, da alle Versuche planmäßig durchgeführt werden konnten. Jedoch ergaben sich trotz der von Wilke et al.⁶⁴ beschriebenen Eignung der Schafslendenwirbelsäule als Versuchsmodell leichte Schwierigkeiten aufgrund der Variabilität der Größe der Wirbelkörper, die als einer der unbekannten Faktoren die Ergebnisse beeinflusste. Obwohl bei der Auswahl der Schafe auf ähnliches Gewicht und ähnliche Statur der Tiere geachtet wurde, stellte sich heraus, dass die Wirbelkörpergröße sich nicht linear zu der Körpergröße verhielt und Unterschiede in den Wirbelkörperendplattenflächen bestanden. Das Verhältnis der Implantatgröße zur Endplattengröße war in einigen Fällen nicht optimal, da das Implantat während der Vorversuche etwas zu groß gewählt wurde. Auch relevant war sicherlich die Einbringung in Levels von L3/4 bis L5/6, deren Endplatten anatomisch etwas unterschiedliche Formen und Flächen aufwiesen. Die relativ kleine Anzahl der Schafe (n=9) und die schwierige Operationsmethode waren weitere Faktoren, die die unterschiedlichen Resultate beeinflusst haben. So fielen zum Beispiel bei den Schafen individuelle Unterschiede bei der Neigung zur generellen Ossifikation ventral um das Implantat herum auf und jedes Tier zeigte bei beiden Implantaten, dem beschichteten und unbeschichteten, ein ähnliches Ergebnis. Diesem Umstand, der erwartet wurde, konnte aber durch das gepaarte Versuchsdesign so weit als möglich Rechnung getragen werden.

Histologisch zeigte sich, dass der Knochen noch nicht vollständig in die Einkerbungen des Cages eingewachsen war und Knochendebris noch im Umbauvorgang vorlag. Eine längere Versuchszeit hätte eventuell bessere osseointegrative Ergebnisse erzielt, jedoch wurde dies nicht erwartet, weil nämlich nach drei Monaten alle Phasen der Knochenheilung durchschritten sein sollten⁶⁹. Ständige Mikrobewegung am Implantat, wie in unserem Versuch vermutet, kann entstehende

Knochenbrücken jedoch immer wieder abreißen und so eine Osseointegration verhindern.

4.3 Operation und Implantat

Die Operationen an sich verliefen mit Ausnahme eines Schafes weitgehend komplikationslos, jedoch konnte leider mit der verwendeten Implantatform und Operationstechnik keine optimale Einbringung des Implantates erfolgen. Der schwierige retroperitoneale Zugang zur Lendenwirbelsäule und das mittige Schraubengewinde des Implantates verursachten ein schräges Einsetzen und ein Überstehen des Implantates nach ventral. Dadurch ergab sich eine Krafteinwirkung des keilförmigen Implantates asymmetrisch zur Längsachse der Wirbelsäule. Die mechanische Belastung, die unter optimalen Bedingungen auf das Implantat ausgeübt wird, wurde durch die Schrägposition wahrscheinlich noch verstärkt und ständige Bewegung des Implantates führte zu einer vermehrt bindegewebigen Integration des Implantates.

Die Keilform des Implantates und die dadurch verursachte lordotische Winkelveränderung waren abhängig vom Knorpel- und Knochenabtrag bei der Einbringung. Die Messung des Winkels und das Ausmaß der Aufklappung korrelierte allerdings nicht mit der Anwachsquote, lässt jedoch die asymmetrische Keilwirkung als möglichen Grund für die nicht optimale Durchwachsung des Implantates mit Knochengewebe nicht ausschliessen.

Kallus entwickelte sich ventral um das Implantat herum. Dieser war bei den acht Schafen sehr unterschiedlich ausgebildet. Die Ausbildung des ventralen Kallus korrelierte negativ mit dem Anwachsquotient. Die instabilen Implantate mit großem Kallus neigten eher zu bindegewebigem Einbau, während die Implantate mit besserer Stabilität eine gute Anwachsquote aufwiesen und somit weniger Reiz hatten, einen ventralen Kallus auszubilden. Daraus wurde geschlossen, dass Mobilität in den Versuchen der vorliegenden Studie ein bindegewebiges Einwachsen förderte. Die Begründung liegt wahrscheinlich in einer Verhinderung des Einwachsens kleiner Knochenbrücken in die 0,9 mm breiten Löcher durch ständige Bewegung des Implantates.

Das Einsetzen zweier Implantate in aufeinander folgende Zwischenwirbelkörperspalten führte wahrscheinlich dazu, dass eine gering größere mechanische Belastung auf beiden versteiften Levels lag, als wenn die Insertion mit einem Level

Abstand vorgenommen worden wäre. Da dieser Effekt eines grösseren Hebelarmes aber bei allen Tieren vorlag und die Implantate wechselweise in kranialer oder kaudaler Position platziert waren, wurde er in der Bewertung nicht beachtet. Er begünstigte allerdings die Mobilität des Implantates und konnte Einfluss auf die relativ geringe Knochenmenge im Implantat gehabt haben.

Andererseits zeigt diese Studie bei der histologischen Auswertung, dass eine beidseitige Verletzung der Wirbelkörperendplatte des dazwischen liegenden Wirbelkörpers keine offensichtlich negativen Auswirkungen hat. Auch waren keine pharmakologischen Wechselwirkungen zwischen den beschichteten und den unbeschichteten Cages auszumachen. Durch die relativ feste und lokal wirksame Beschichtung waren diese auch nicht zu erwarten. Vielmehr wurde angenommen, dass die Beschichtung nur im direkten, anliegenden Umfeld auf die Knochenzellen wirken würde.

4.4 Histologie

Die Fixationsmethode der Präparate war erfolgreich und die Dickschnitte waren gut mit PMMA durchtränkt. Die Dickschnitte konnten in dem implantatnahen Bereich gut angefärbt werden und zeigten gute Erkennbarkeit des Details. Das Sägen der Dickschnitte in der Innenlochsäge war in der Weise problematisch, dass Schnitte mit unterschiedlicher Dicke innerhalb desselben Schnittes entstanden. Dieser Effekt war durch das Titanimplantat in der Mitte des Schnittes verursacht und trat bei allen Schnitten in unterschiedlich starker Ausprägung auf. Ein gleichmäßiges Abschleifen der Schnitte war nicht immer möglich und es entstanden dorsal in der Peripherie und in den Randbereichen der Schnitte Areale, die nicht oder nur schlechter geschliffen und poliert werden konnten. Diese Areale waren dann teilweise noch mit Klebstoff überzogen und konnten somit auch nicht angefärbt werden. Sie befanden sich jedoch nie im auszuwertenden Bereich. Sie erscheinen in den Schnittbildern als nicht angefärbte Flächen auf der linken Bildseite (dorsal).

Die qualitative Beurteilung der im Cage befindlichen Zellen erfolgte im Mikroskop mit Fünfer-, Zehner- und Zwanzigerobjektiv. Nach einer allgemeinen zellulären Beurteilung wurde entschieden, die Gewebe in vier Arten zu unterteilen. Diese traten in unterschiedlicher Mengenverteilung in jedem Schnitt auf. Es handelt sich um: Knochengewebe, Knorpelgewebe, Bindegewebe und Debris. Wie auch in der Literatur beschrieben findet Knochenheilung unter nicht komplett stabilen Verhältnissen über die

Ausbildung von Granulationsbewebe, Bindegewebe, Faserknorpel und Mineralisation der Gewebe statt⁶⁹. Diese Gewebe wurden in jedem Implantat nachgewiesen. Es fand sich in überwiegendem Anteil um das gesamte Implantat Bindegewebe mit Fibrozyten, in welches besonders im Inneren des Implantates proteoglykanreiche Knorpelinseln mit Chondrozyten-artige Zellen eingelagert waren. Auf den Aussenseiten des Implantates grenzte das Bindegewebe entweder direkt an Knochengewebe oder wurde durch eine Schicht von hyalinem Knorpel mit diesem verbunden. Solcher hyaliner Knorpel trat auch in Kontakt mit dem Implantat und Knochengewebe auf. Faserknorpel konnte auch an der dorsalen Spitze der Implantate im Übergang zur restlichen Bandscheibe nachgewiesen werden und wurde ebenso wie der Debris bei der Insertion in das Implantat eingedrückt.

Knochengewebe im Inneren des Implantates stellte sich als lamellär eingewachsener Knochen mit Osteoblastensäumen dar, der direkten Kontakt zum Implantat hatte. Als Knochengewebe ausgewertet wurden auch Knochenstücke im Debris, an denen Merkmale von Osteonen sichtbar waren. Fast alle Implantate wiesen vor allem im vorderen Bereich des Implantates eine Füllung mit Knochendebris auf. Dieser Debris kam vermehrt bei den unbeschichteten Implantaten vor, so dass man davon ausgehen kann, dass die Beschichtungen, insbesondere die Kollagenbeschichtung, die auch im Inneren des Implantates eine dichte Füllung aufwies, keinen Platz für ein Eindringen von Debris bei der Insertion ließ.

Im Debris enthalten war überwiegend nicht zelluläres mineralisiertes Material, in das vereinzelt Knorpel-ähnliche Zellen und Fibrozyten eingebettet waren. Stark blau angefärbtes Material konnte in einigen Fällen aufgrund seiner Osteon-Struktur als Knochengewebe klar abgegrenzt werden, jedoch konnten in dessen Umgebung keine Osteoblasten und Osteoklasten dargestellt werden. Vermutlich handelt es sich bei dem Debris um Reste des abgeraspelten Knochens und Faserknorpels, die beim Einschieben in die Kavitäten des Implantates hineingedrückt wurden. Diese waren teilweise nachträglich mineralisiert und noch im Um- beziehungsweise Abbau. Das Knochenmehl, oder auch „milling powder“ befand sich teilweise im Abbau, was man an angrenzenden Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen sehen konnte. In Bereichen mit einer feinen, gleichmäßigen Feinmineralisation wurde von einer neuen Mineralisation von Bindegewebe ausgegangen.

4.5 Wirkung der Beschichtungen

Eine positive osseointegrative Wirkung kann anhand der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Warum sind die Resultate unstimmig mit den Erwartungen, die durch früher durchgeführte wissenschaftliche *in-vitro* und *in-vivo* Studien^{52,55,59-61} belegt sind? Es stellt sich die Frage, ob das Ergebnis durch multiple Variablen zu stark beeinflusst wurde oder ob die neuartige Aufbringung der Beschichtung überhaupt bei Spine Cages einen Einfluss hat.

Die Beschichtung erfolgte beim KollagenI/CS mit Dippen. Es wurde eine neuartige Ordnung der Fasern angewandt, die der natürlichen Anordnung ähnlicher ist, und das Chondroitinsulfat wurde ohne Additive aufgetragen. Vor Einsetzen des Cages war die Beschichtung makroskopisch auf dem Implantat sichtbar und es ist anzunehmen, dass ein primäres Eindringen von Zellen in den Cage dadurch verlangsamt wurde, weil die 0,9 mm großen Löcher mit Beschichtung überzogen waren und das Cage nachweislich mit K/CS gefüllt war.

Die Bisphosphonatbeschichtung wurde durch Spraysen aufgetragen. Sie war mit einem Wachs eingebunden, das die Verfügbarkeit am Ort über einen längeren Zeitraum garantieren sollte. Während die Anwachsquotienten leicht unter den unbeschichteten Implantaten lagen, war die Füllung mit Knochengewebe im Inneren etwas erhöht. Ein positiver Effekt konnte der Beschichtung in dieser Hinsicht nachgewiesen werden.

4.6 Schlussfolgerung

Nachfolgeprojekte dieser Beschichtungen in diesem Schafmodell bedürfen einiger Überlegung, da die Ergebnisse für die Beschichtungen sehr uneinheitlich ausfielen. Die vorherigen Studien mit Zahnimplantaten⁶⁸, in denen die beiden Beschichtungen gute osteogene Eigenschaften zeigten, waren mit etablierten Tierversuchmodellen durchgeführt. Um auch im Wirbelsäulenbereich solch definierte Ergebnisse zu erzielen, müssen etliche Variablen ausgeschaltet werden und es muss eine stabile Fixation gewährleistet sein.

Die Anwendung der Auswertungstechnik mit der Möglichkeit der Fixation des Implantates post-mortem war erfolgreich. Diese Technik kann in weiteren Studien angewendet werden, bei denen osseointegrative Prozesse in porösen Implantaten beurteilt werden sollen. Zur Verbesserung des Knochen- Implantat- Kontaktes sollten Implantatform und -größe unbedingt angepasst werden. Bei der Anwendung in der Lendenwirbelsäule wäre eine zusätzliche posteriore Stabilisation der Wirbelsäule oder

eine anteriore Platte möglich. Eventuell ist eine Computer Tomografie- Untersuchung zur Beurteilung der Wirbelkörperendplattengröße sinnvoll, um eine optimale Anpassung zu erreichen. Die Keilform des Implantates und/oder die Implantathöhe sollte verringert werden, um weniger lordotische Aufklappung der Wirbel zu verursachen. Unbedingt beachtet werden sollte auch die senkrechte Einbringung des Implantates in den Zwischenwirbelspalt. Das mittige Gewinde ist für einen retroperitonealen Zugang ungeeignet, also muss entweder der Zugang oder das Gewinde verändert werden. Auch die Tiefe der Einbringung in den Zwischenwirbelkörperspalt sollte beachtet werden, um das ventrale Hervorstehen zu vermeiden. Eine kleinere Cageform wird dies begünstigen, bei einer senkrechten Einbringung kann jedoch auch die zur Verfügung stehende Endplatte besser ausgenutzt werden.

Obwohl die Porengröße laut von Dörnberg¹⁹ keinen Einfluss auf das Knocheneinwachsen haben soll, ist die Frage nach der am besten geeigneten Porengröße im Zwischenwirbelkörperspalt immer noch offen. Es ist jedoch anzunehmen, dass das Einwachsen primär durch ständige Mikrobewegung verhindert wurde und nicht durch einen zu kleinen oder zu großen Hohlraum.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

ALIF	anteriore lumbare interkorporelle Fusion
BIC	Bone-Implant-Contact
BP	Bisphosphonat
BMP	bone morphogenic protein
CS	Chondroitinsulfat
dist	distal
ECM	extrazelluläre Matrix
K	Kollagen
li	links
PLF	posterolaterale Fusion
PLIF	posteriore lumbare interkorporelle Fusion
PMMA	Polymethylmethacrylat
prox	proximal
re	rechts

5.2 Tabellen

Schaf Nr	Kraniales Implantat	LWS- position	Kaudales Implantat	LWS- position
1	Kollagen	4/5	unbeschichtet	5/6
3	Bisphosphonat	4/5	unbeschichtet	5/6
4	unbeschichtet	3/4	Kollagen	4/5
5	unbeschichtet	3/4	Bisphosphonat	4/5
6	unbeschichtet	3/4	Bisphosphonat	4/5
7	unbeschichtet	3/4	Kollagen	4/5
8	unbeschichtet	4/5	Kollagen	5/6
9	Bisphosphonat	3/4	unbeschichtet	4/5

Tab. 1: Verteilungsschema der Implantate auf die Versuchstiere

Schaf Nr.	LW zahl	Implantat Lokalisa- tion	Be- schich- tung	Ossi- fika- tion	Über- stan- d	Abweich- ung von 90°	Anwachs- quotient 38,8 in %	Anwachs- quotient 36,4 in %	Durchsch- nitt von 38,8/ 36,4
3751	6	4/5	Koll/CS	+	+	33°	0	0	0,00
		5/6	Leer	+	+	5°	10	0	5,00
3753	6	3/4	Bispho	-	-	20°	70	60	65,00
		4/5	Leer	-	++	24°	90	80	85,00
3754	7	3/4	Leer	+	++	29°	85	70	77,50
		4/5	Koll/CS	+	-	16°	85	90	87,50
3755	7	3/4	Leer	-	+	35°	70	30	50,00
		4/5	Bispho	++	+	33°	20	5	12,50
3756	6	3/4	Leer	++	+	23°	75	90	82,50
		4/5	Bispho	-	-	14°	30	25	27,50
3757	6	3/4	Leer	-	-	32°	75	75	75,00
		4/5	Koll/CS	+	-	25°	50	85	67,50
3758	7	4/5	Leer	++	+	33°	55	90	72,50
		5/6	Koll/CS	+	-	27°	35	20	27,50
3759	6	3/4	Bispho	++	+	17°	65	85	75,00
		4/5	Leer	-	+	12°	65	80	72,50

Tabelle 2: Verteilungsschema Schaf/Lokalisation/Beschichtung/ Auswertung

5.3 Abbildungen

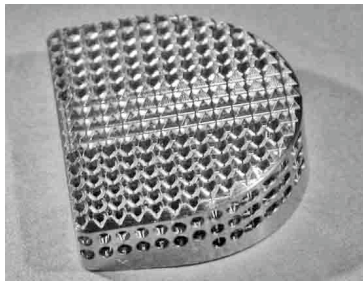
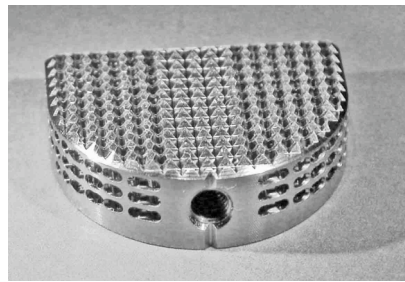
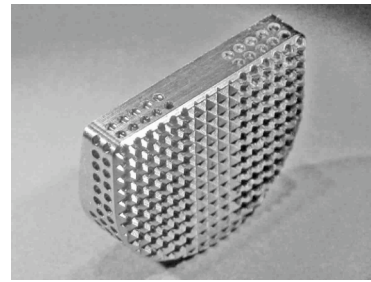


Abb. 1: Spine cage



Ansicht von ventral



Ansicht von dorsal



Abb. 2: Sägehalterung für grobes Zuschneiden

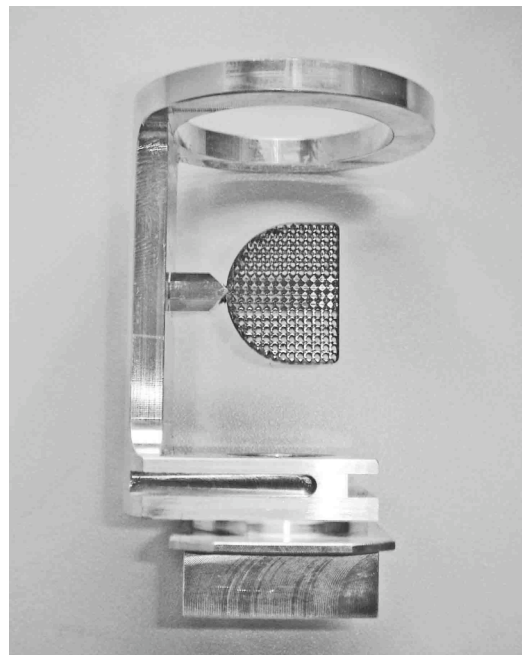


Abb. 3: Fixationshalterung für die Innenlochsäge für histologische Dickschnitte

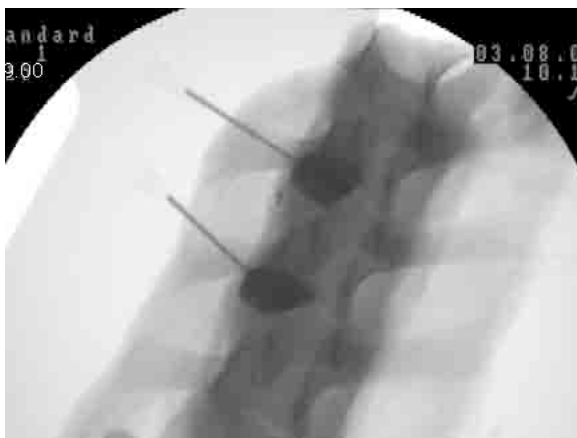


Abb. 4: Implantatlokalisierung mit C-Bogen

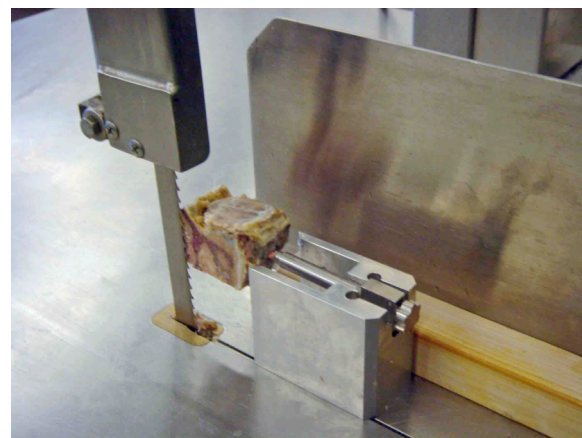


Abb. 5: Sägehalterung mit Probe

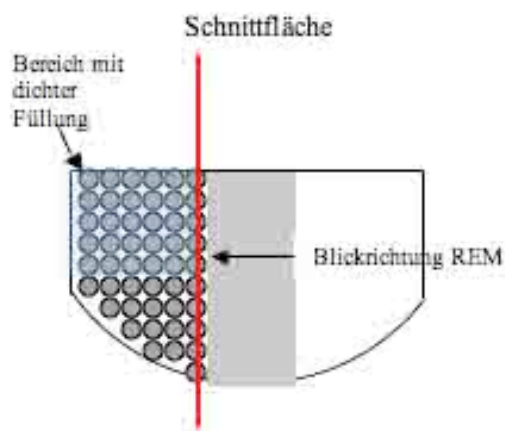
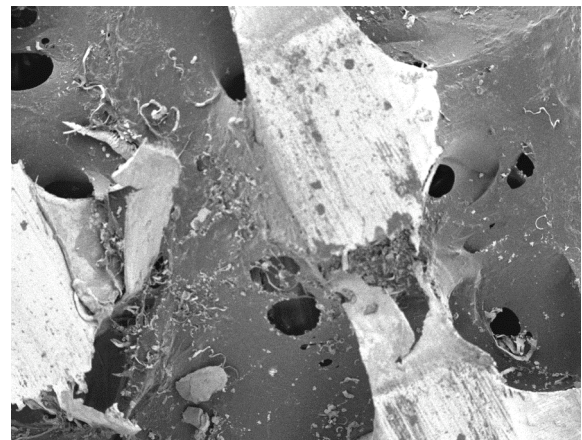


Abb. 6: Aufschneiden des Cages zur Kontrolle der Füllung mit Koll/CS Beschichtung



Cage VV 2mg/ml +10 %CS Rv, 04.04.07, 4,0kV, 11mm, 50x — 400 µm —

Abb. 7: REM Aufnahme des Bereiches dichter Füllung mit Koll/CS

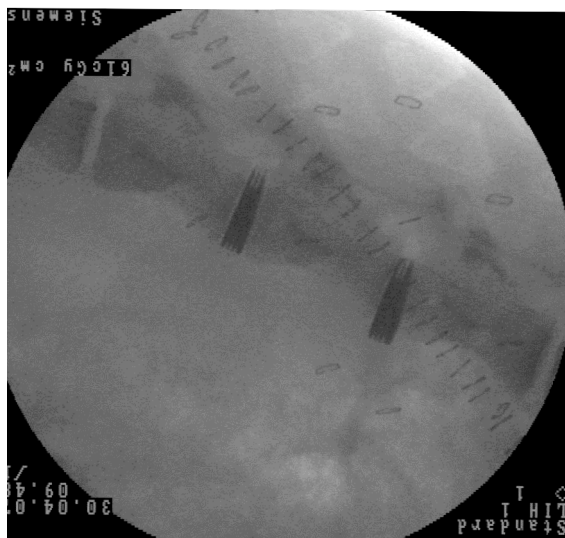


Abb. 8: Post Op, C-Bogen-lateral

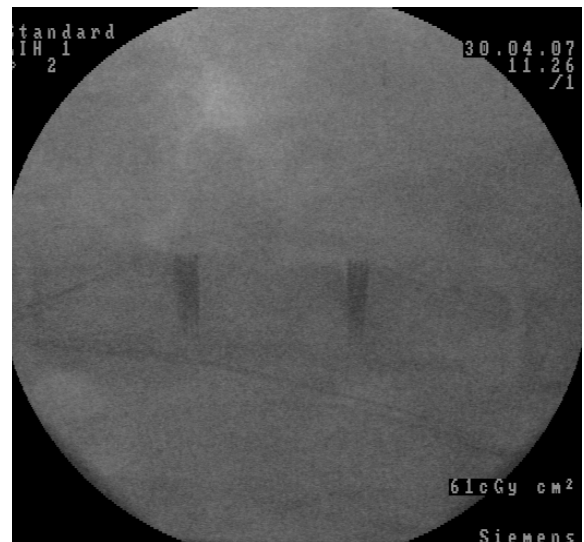


Abb. 9: Post Op, C-Bogen-ventrodorsal
(oben=links)

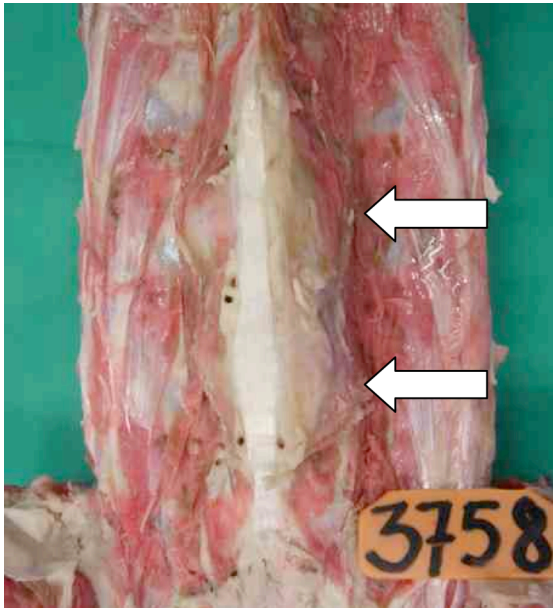


Abb. 10: Post Mortem Lendenwirbelsäule, Ansicht von ventral. Pfeile markieren Umfangsvermehrung im Fusionsbereich.

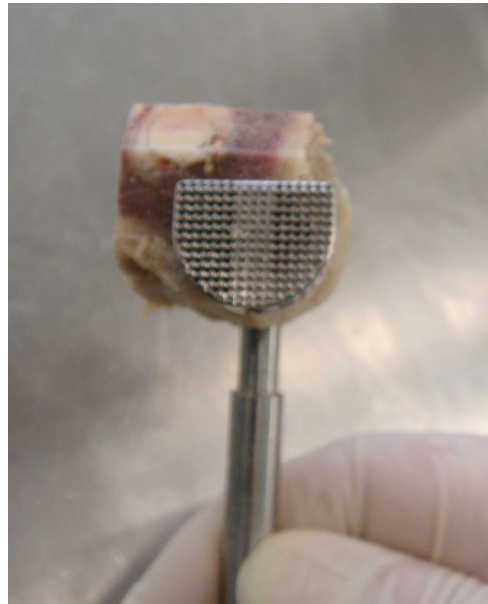


Abb. 11: Demonstration eines Implantat auf einer Probe

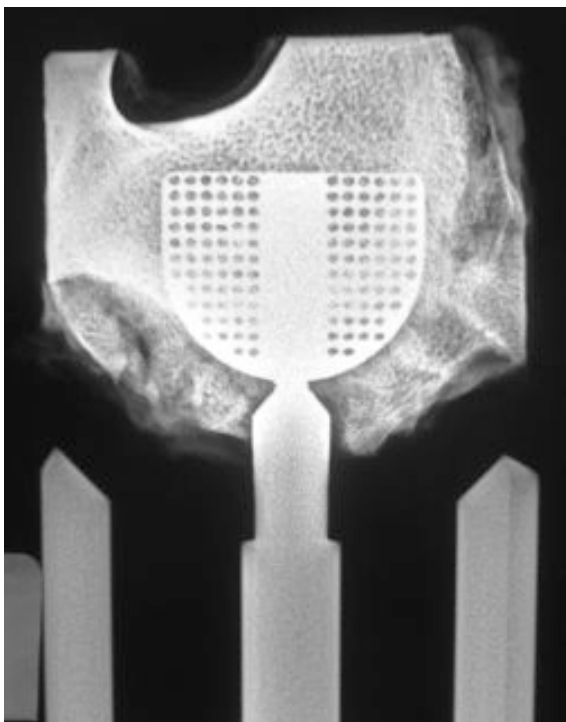


Abb. 12: Halterung-Faxitron, kraniokaudal
Anhand dieser Aufnahme konnte die
Position des Cages beurteilt werden.

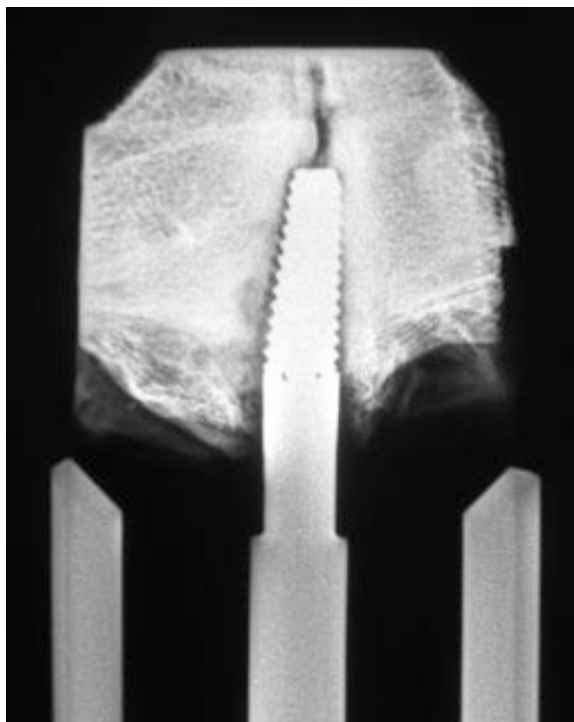


Abb. 13: Halterung-Faxitron, laterolateral

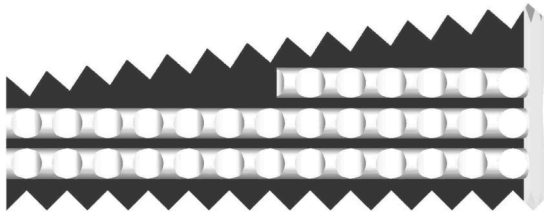


Abb. 14: Ebene der Zacken

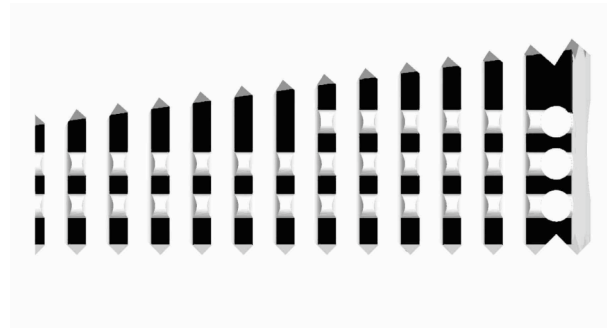


Abb. 15: Ebene der Quadrate

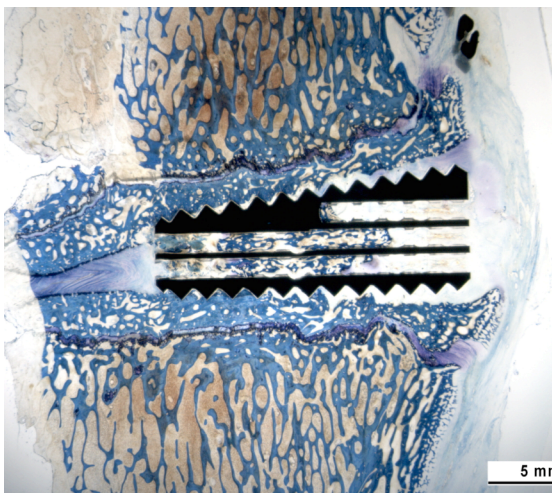


Abb. 16: Ebene der Zacken mit Probe

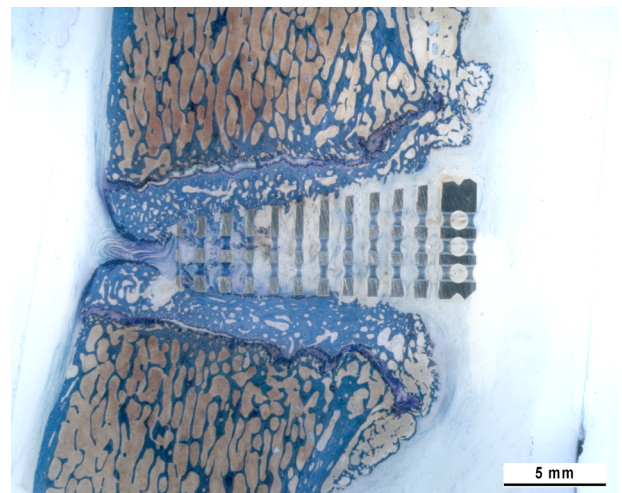


Abb. 17: Ebene der Quadrate mit Probe

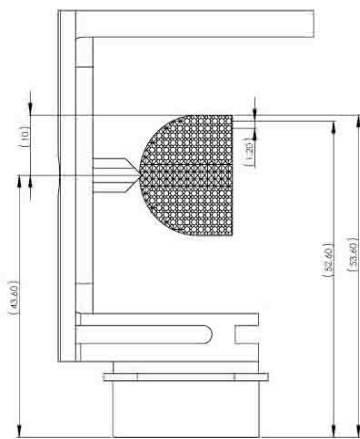


Abb. 18: Implantat in Fixationshalterung. Die Mitte des Steges liegt bei 43,6 mm über dem Fuss. Die linke Implantatseite ist nach unten gerichtet.

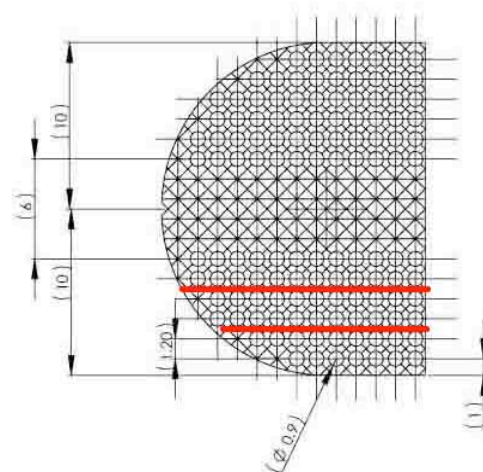


Abb. 19: Die beiden Ebenen 38,8 und darunter 36,4 sind Zacken-ebenen. Sie wurden für den Anwachsquotienten ausgewertet.

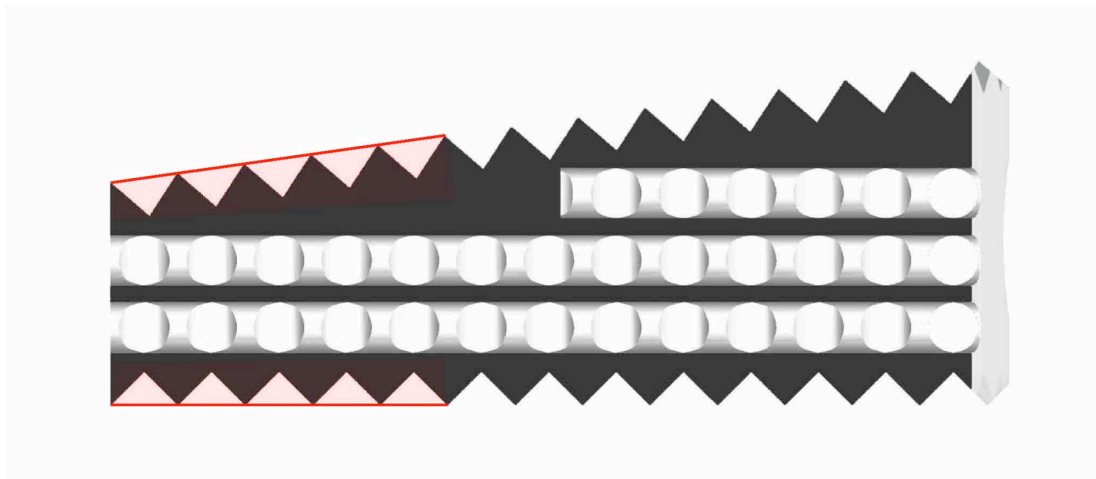


Abb. 20: Zacken-Ebene mit Markierung der Zone, in der Knochengewebe ausgewertet wurde. Schema zur Berechnung des Anwachsquotienten.

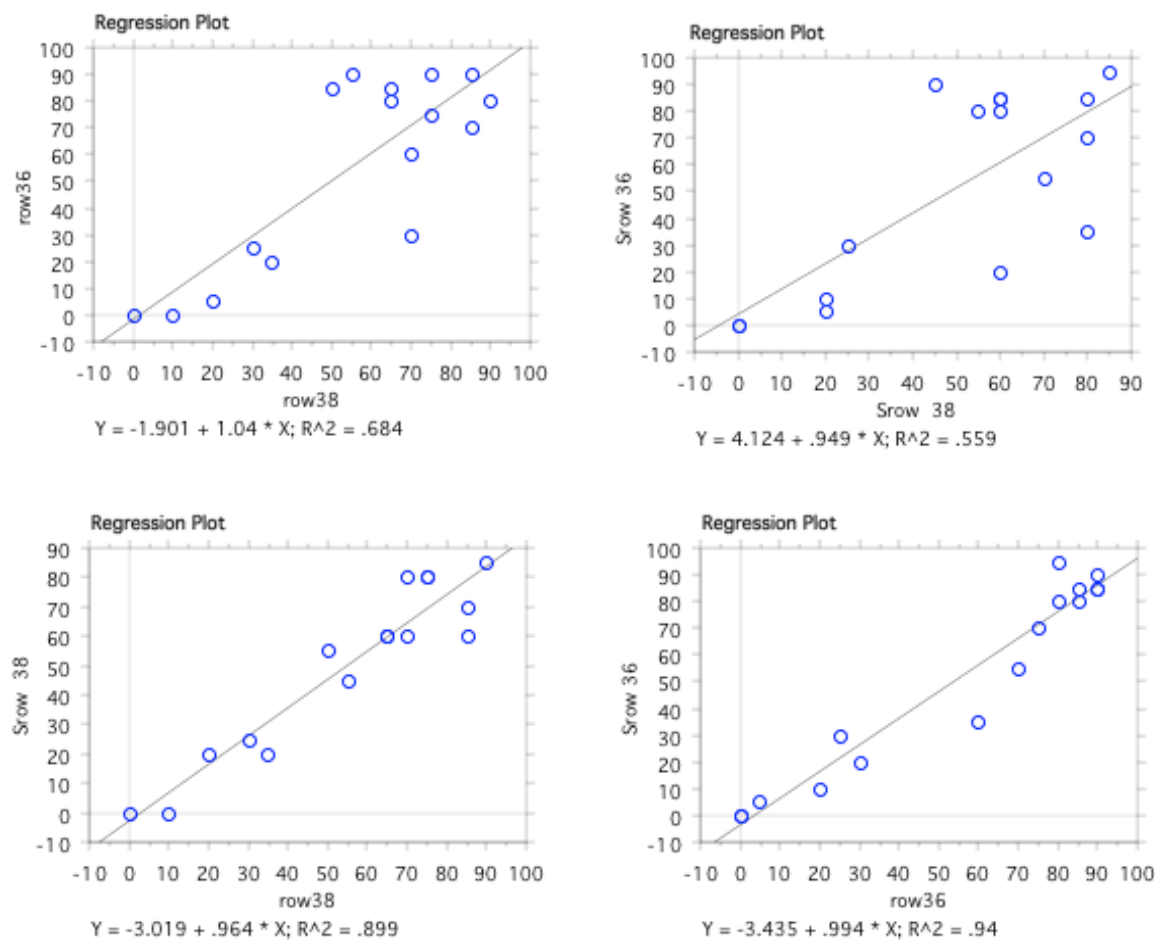


Abb. 21: oben links - Vergleich der zwei Ebenen 36 (36,4) und 38 (38,8) von Prüfer 1
oben rechts- Vergleich der zwei Ebenen 36,4 und 38,8 von Prüfer 2
unten links- Vergleich der beiden Prüfer gegeneinander der Ebene 38,8
unten rechts- Vergleich beider Prüfer gegeneinander der Ebene 36,4

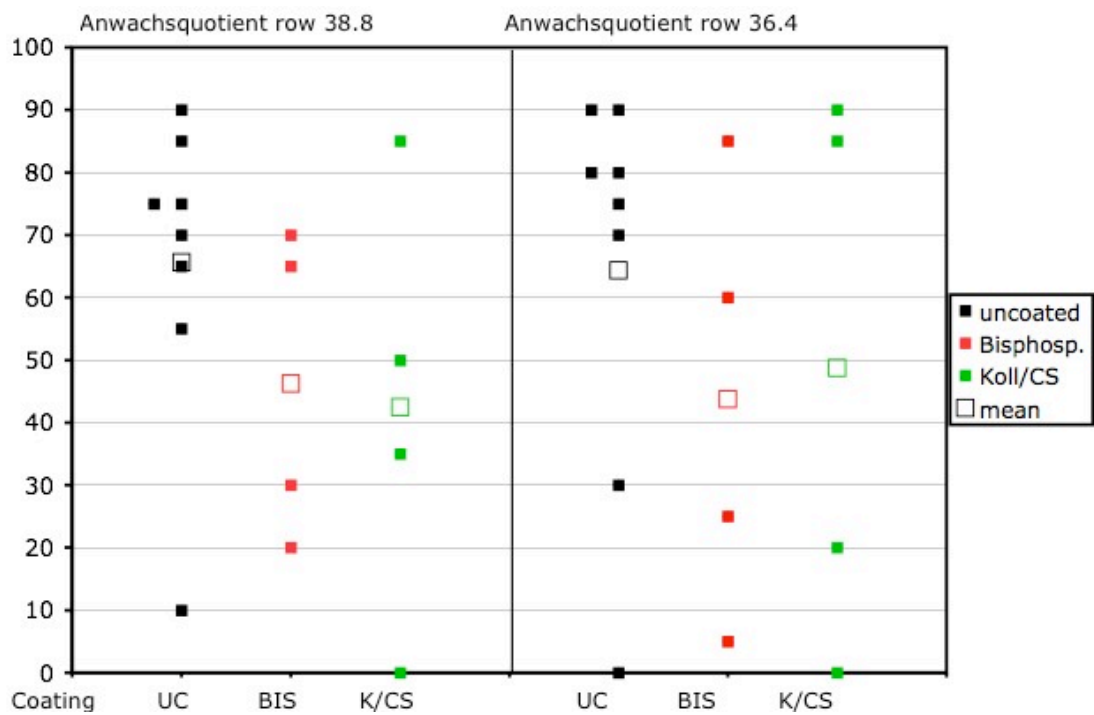


Abb.22: Resultate Anwuchsquotienten von zwei Schnittebenen 38.8 und 36.4

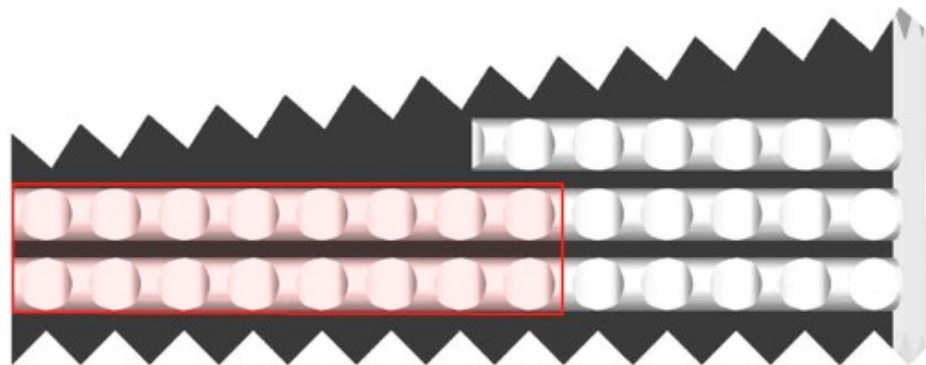


Abb. 23: Zacken- Ebene mit Markierung der Zone, in der vier verschiedene Gewebearten ausgewertet wurde.

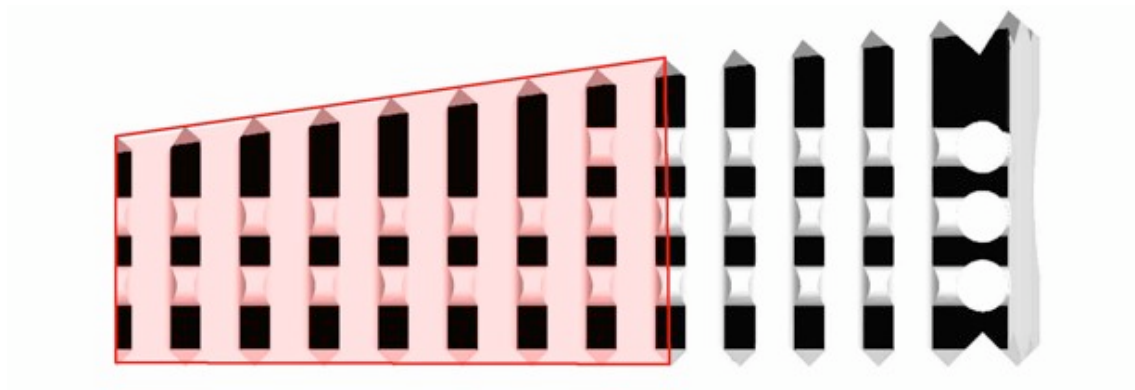


Abb. 24: Quadrat- Ebene mit Markierung der Zone, in der vier verschiedene Gewebearten ausgewertet wurde.

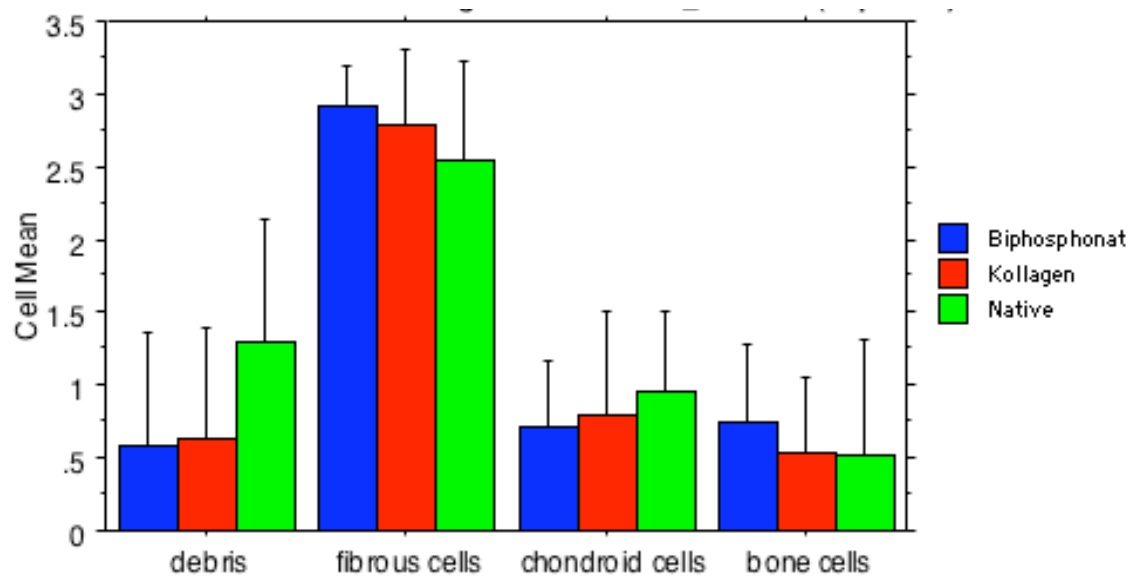


Abb. 25: Gewebematrizes im Inneren des Cages. (Debris, Fibröses Gewebe, Knorpelgewebe, Knochengewebe)

6 Literaturverzeichnis

1. Thome C: [Chronic back pain--operative therapeutic options in chronic back pain]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 44:48-55, 2009.
2. Katz JN: Lumbar spinal fusion. Surgical rates, costs, and complications. *Spine* 20:78S-83S, 1995.
3. Burkus JK, Schuler TC, Gornet MF, et al: Anterior lumbar interbody fusion for the management of chronic lower back pain: current strategies and concepts. *Orthop Clin North Am* 35:25-32, 2004.
4. Steffen T, Marchesi D, Aebi M: Posterolateral and anterior interbody spinal fusion models in the sheep. *Clin Orthop Relat Res*:28-37, 2000.
5. Jakobsen T, Kold S, Bechtold JE, et al: Local alendronate increases fixation of implants inserted with bone compaction: 12-week canine study. *J Orthop Res* 25:432-441, 2007.
6. Stadlinger B, Pilling E, Mai R, et al: Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *J Mater Sci Mater Med* 19:1043-1049, 2008.
7. Aunoble S, Hoste D, Donkersloot P, et al: Video-assisted ALIF with cage and anterior plate fixation for L5-S1 spondylolisthesis. *J Spinal Disord Tech* 19:471-476, 2006.
8. Weber J, Vieweg U: [Anterior lumbar interbody fusion (ALIF) using a cage with stabilization]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 144:40-45, 2006.
9. Mayer HM: The ALIF concept. *Eur Spine J* 9 Suppl 1:S35-43, 2000.
10. Mirza SK, Deyo RA: Systematic review of randomized trials comparing lumbar fusion surgery to nonoperative care for treatment of chronic back pain. *Spine* 32:816-823, 2007.
11. Ibrahim T, Tleyjeh IM, Gabbar O: Surgical versus non-surgical treatment of chronic low back pain: a meta-analysis of randomised trials. *Int Orthop* 32:107-113, 2008.
12. Loguidice VA, Johnson RG, Guyer RD, et al: Anterior lumbar interbody fusion. *Spine* 13:366-369, 1988.
13. Baramki HG, Papin P, Steffen T: A surgical approach to the ventral aspect of the lumbar vertebrae in the sheep model. *Surg Radiol Anat* 22:25-27, 2000.
14. Vazquez RM, Gireesan GT: Balloon-assisted endoscopic retroperitoneal gasless (BERG) technique for anterior lumbar interbody fusion (ALIF). *Surg Endosc* 17:268-272, 2003.
15. Chung SK, Lee SH, Lim SR, et al: Comparative study of laparoscopic L5-S1 fusion versus open mini-ALIF, with a minimum 2-year follow-up. *Eur Spine J* 12:613-617, 2003.
16. Hasegawa K, Abe M, Washio T, et al: An experimental study on the interface strength between titanium mesh cage and vertebra in reference to vertebral bone mineral density. *Spine* 26:957-963, 2001.
17. Lund T, Oxland TR, Jost B, et al: Interbody cage stabilisation in the lumbar spine: biomechanical evaluation of cage design, posterior instrumentation and bone density. *J Bone Joint Surg Br* 80:351-359, 1998.
18. Steffen T, Tsantrizos A, Fruth I, et al: Cages: designs and concepts. *Eur Spine J* 9 Suppl 1:S89-94, 2000.

19. Marie-Cécile von Doernberg: Evaluation of the Biodegradation Behaviour of Beta-TCP Cylinders With Four Different Pore Diameters. An in vivo Study. 2005.
20. Stock M: Underlying mechanisms of Endosseous Integration at the Material-Biosystem Interface. 2003.
21. Placko HE, Mishra S, Weimer JJ, et al: Surface characterization of titanium-based implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 15:355-363, 2000.
22. Spruit M, Falk RG, Beckmann L, et al: The in vitro stabilising effect of polyetheretherketone cages versus a titanium cage of similar design for anterior lumbar interbody fusion. *Eur Spine J* 14:752-758, 2005.
23. Krijnen MR, Valstar ER, Smit TH, et al: Does bioresorbable cage material influence segment stability in spinal interbody fusion? *Clin Orthop Relat Res* 448:33-38, 2006.
24. Jiya T, Smit T, Deddens J, et al: Posterior lumbar interbody fusion using nonresorbable poly-ether-ether-ketone versus resorbable poly-L-lactide-co-D,L-lactide fusion devices: a prospective, randomized study to assess fusion and clinical outcome. *Spine* 34:233-237, 2009.
25. Lane JD ME: Transperitoneal approach to intervertebral disc in lumbar area. *Ann Surg* 27:537-551, 1948.
26. Stauffer RN, Coventry MB: Anterior interbody lumbar spine fusion. Analysis of Mayo Clinic series. *J Bone Joint Surg Am* 54:756-768, 1972.
27. Sasso RC, LeHuec JC, Shaffrey C: Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. *J Spinal Disord Tech* 18 Suppl:S77-81, 2005.
28. Robertson PA, Wray AC: Natural history of posterior iliac crest bone graft donation for spinal surgery: a prospective analysis of morbidity. *Spine* 26:1473-1476, 2001.
29. Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, et al: Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28:134-139, 2003.
30. Kager AN, Marks M, Bastrom T, et al: Morbidity of iliac crest bone graft harvesting in adolescent deformity surgery. *J Pediatr Orthop* 26:132-134, 2006.
31. Al-Sayyad MJ, Abdulmajeed TM: Fracture of the anterior iliac crest following autogenous bone grafting. *Saudi Med J* 27:254-258, 2006.
32. Bednar DA, Al-Tunaib W: Failure of reconstitution of open-section, posterior iliac-wing bone graft donor sites after lumbar spinal fusion. Observations with implications for the etiology of donor site pain. *Eur Spine J* 14:95-98, 2005.
33. Khanna G, Lewonowski K, Wood KB: Initial results of anterior interbody fusion achieved with a less invasive bone harvesting technique. *Spine* 31:111-114, 2006.
34. Steffen T, Downer P, Steiner B, et al: Minimally invasive bone harvesting tools. *Eur Spine J* 9 Suppl 1:S114-118, 2000.
35. Peelle MW, Rawlins BA, Frelinghuysen P: A novel source of cancellous autograft for ACDF surgery: the manubrium. *J Spinal Disord Tech* 20:36-41, 2007.
36. Risbud MV, Shapiro IM, Guttapalli A, et al: Osteogenic potential of adult human stem cells of the lumbar vertebral body and the iliac crest. *Spine* 31:83-89, 2006.
37. Neen D, Noyes D, Shaw M, et al: Healos and bone marrow aspirate used for lumbar spine fusion: a case controlled study comparing healos with autograft. *Spine* 31:E636-640, 2006.
38. Finkemeier CG: Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A:454-464, 2002.

39. Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965.
40. Carlisle E, Fischgrund JS: Bone morphogenetic proteins for spinal fusion. *Spine J* 5:240S-249S, 2005.
41. Cunningham BW, Shimamoto N, Seftor JC, et al: Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction. *Spine J* 2:11-24, 2002.
42. Magin MN, Delling G: Improved lumbar vertebral interbody fusion using rhOP-1: a comparison of autogenous bone graft, bovine hydroxylapatite (Bio-Oss), and BMP-7 (rhOP-1) in sheep. *Spine* 26:469-478, 2001.
43. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, et al: The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report. *Spine* 25:376-381, 2000.
44. Adams JC WF: Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix *Development* 117:1183-1198, 1993.
45. Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, et al: Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation. *Clin Oral Implants Res* 16:563-569, 2005.
46. Fischer U, Hempel U, Becker D, et al: Transforming growth factor beta1 immobilized adsorptively on Ti6Al4V and collagen type I coated Ti6Al4V maintains its biological activity. *Biomaterials* 24:2631-2641, 2003.
47. Bierbaum S, Beutner R, Hanke T, et al: Modification of Ti6Al4V surfaces using collagen I, III, and fibronectin. I. Biochemical and morphological characteristics of the adsorbed matrix. *J Biomed Mater Res A* 67:421-430, 2003.
48. Rammelt S, Illert T, Bierbaum S, et al: Coating of titanium implants with collagen, RGD peptide and chondroitin sulfate. *Biomaterials* 27:5561-5571, 2006.
49. Bierbaum S, Douglas T, Hanke T, et al: Collageneous matrix coatings on titanium implants modified with decorin and chondroitin sulfate: characterization and influence on osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res A* 77:551-562, 2006.
50. Becker D, Geissler U, Hempel U, et al: Proliferation and differentiation of rat calvarial osteoblasts on type I collagen-coated titanium alloy. *J Biomed Mater Res* 59:516-527, 2002.
51. Tippelt S, Ma C, Witt M, et al: Collagen type I prevents glyoxal-induced apoptosis in osteoblastic cells cultured on titanium alloy. *Cells Tissues Organs* 177:29-36, 2004.
52. Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, et al: Evaluation of osseointegration of dental implants coated with collagen, chondroitin sulphate and BMP-4: an animal study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 37:54-59, 2008.
53. Douglas T, Heinemann S, Hempel U, et al: Characterization of collagen II fibrils containing biglycan and their effect as a coating on osteoblast adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 19:1653-1660, 2008.
54. Douglas T, Heinemann S, Mietrach C, et al: Interactions of collagen types I and II with chondroitin sulfates A-C and their effect on osteoblast adhesion. *Biomacromolecules* 8:1085-1092, 2007.
55. Rammelt S, Heck C, Bernhardt R, et al: In vivo effects of coating loaded and unloaded Ti implants with collagen, chondroitin sulfate, and hydroxyapatite in the sheep tibia. *J Orthop Res* 25:1052-1061, 2007.
56. Peter B, Zambelli PY, Guicheux J, et al: The effect of bisphosphonates and titanium particles on osteoblasts: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 87:1157-1163, 2005.

57. Peter B, Gauthier O, Laib S, et al: Local delivery of bisphosphonate from coated orthopedic implants increases implants mechanical stability in osteoporotic rats. *J Biomed Mater Res A* 76:133-143, 2006.
58. Tanzer M, Karabasz D, Krygier JJ, et al: The Otto Aufranc Award: bone augmentation around and within porous implants by local bisphosphonate elution. *Clin Orthop Relat Res* 441:30-39, 2005.
59. Skoglund B, Holmertz J, Aspenberg P: Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J Orthop Res* 22:1108-1113, 2004.
60. Tengvall P, Skoglund B, Askendal A, et al: Surface immobilized bisphosphonate improves stainless-steel screw fixation in rats. *Biomaterials* 25:2133-2138, 2004.
61. Yoshinari M, Oda Y, Inoue T, et al: Bone response to calcium phosphate-coated and bisphosphonate-immobilized titanium implants. *Biomaterials* 23:2879-2885, 2002.
62. Becker Z: A Biomimetic Calcium Phosphate Coating connects Bone and Implants Surfaces. *BoneZone*, 2003.
63. Peter B, Pioletti DP, Laib S, et al: Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 36:52-60, 2005.
64. Wilke HJ, Kettler A, Claes LE: Are sheep spines a valid biomechanical model for human spines? *Spine* 22:2365-2374, 1997.
65. Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*:S56-65, 1998.
66. Wilke HJ, Kettler A, Wenger KH, et al: Anatomy of the sheep spine and its comparison to the human spine. *Anat Rec* 247:542-555, 1997.
67. Foster MR, Allen MJ, Schoonmaker JE, et al: Characterization of a developing lumbar arthrodesis in a sheep model with quantitative instability. *Spine J* 2:244-250, 2002.
68. Voelter K: in vivo Studie an Schafen zum Vergleich von Dentalimplantaten im Hinblick auf Oberfläche und Osseointegration. 2007.
69. Rüedi: AO principles of fracture management. 2007.
70. Sandhu HS, Toth JM, Diwan AD, et al: Histologic evaluation of the efficacy of rhBMP-2 compared with autograft bone in sheep spinal anterior interbody fusion. *Spine* 27:567-575, 2002.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg für Ihre herzliche Betreuung während meines Forschungsjahres und Ihre vielen lehrreichen Lektionen. Bei Herrn Prof. Dr. Jörg A. Auer, möchte ich mich herzlich für seine Unterstützung der MSRU bedanken und bei Gabi Schmid für Ihre geduldige und treue Organisation.

Herrn Prof. Thomas Steffen danke ich vielmals für die professionelle Betreuung als akademischer Projektpartner und die Übernahme des Korreferates, sowie Herrn Christian Schaller für die Konstruktion der Implantate, Halterungen und Werkzeuge.

Meinem industriellen Projektpartner Falko Schlottig (Nexilis/Thommen Medical) danke ich sehr für die gute Zusammenarbeit und umfangreiche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Professor Hans Geyer, Urs Müller und Katrin Süss, Institut für Veterinäranatomie der Universität Zürich, die mir bei der Präparation mit großem Einsatz geholfen haben.

Ein herzliches Dankeschön an unsere lieben Laboranten Käthi Kämpf, Kati Zlinsky und Sabina Wunderlin. Vielen Dank auch an Frau Dr. Monika Hilbe von der Pathologie.

Rösli und Gottfried Knüsel vom Staffeleggghof danke ich für Ihren ständigen Einsatz und Rainer Egle für seinen IT Beistand.

Vielen Dank an die Anaesthesie der Pferdeklinik, insbesondere Simone Ringer, die das Anaesthesie Protokoll erstellte, und an die Radiologie. Auch danke ich dem gesamten Team der Rinderklinik, den Fahrern Werni, Alois und Markus und allen Tierpflegern, ganz besonders Kisi und Brigitt Eberle.

Ein ganz herzliches Dankeschön an meine Kollegen aus der MSRU, die ich sicherlich nie vergessen werde: Kiki Wedel, Karolin Kühn, Karina Klein, Hannah Junge, Birthe Pegel, Kristina Biermeier, Stephanie von Plocki, Dorothee Heidenreich, Sven Nielsen, Bernadette Linsbichler, Silvana Manzanell, Marcella v. Salis-Soglio, Anja und Martin Waselau, Käthi Kämpf, Dinah Streifeneder, Lena und Oliver Salesov, Jens Langhoff, Corinne Invernizzi, Katrin Völter, Alexander Stahl, Friederike Ohle, Sabine Koch, Katja Nuss und Peter Kronen.

Ganz herzlich danke ich meiner Familie, mit deren Liebe, Hilfe und Unterstützung ich stets rechnen kann.

Curriculum Vitae

Name	Inga Charlotte Rath geb. Plate
Geburtstag	05.05.1979
Geburtsort	Bremen, Deutschland
Nationalität	Deutsch
Sept. 1991 – Juni 1998	Albert Einstein Gymnasium, Buchholz in der Nordheide, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Aug. 1998 – Mai 1999	Besuch der Sprachschule Don Quijote in Barcelona, Salamanca und Granada, Abschluss: DELE
Sept. 2000 - Juli. 2002	Studium der Veterinärmedizin an der Szent Istvan Universität, Budapest, Ungarn. Abschluss: Physikum
Okt. 2000 - Mai. 2006	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
Sept. 2004 - Juli 2005	Erasmus-Austauschsemester an der Szent Istvan Universität, Budapest, Ungarn
Mai. 2006	Approbation als Tierärztin, Universität Berlin
März 2007 –März 2008	Mitarbeit in der MSRU, Pferdeklunik der Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich. Dissertation bei Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, ECVS, Pferdeklunik der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich, MSRU
Apr. 2008 – Apr. 2009	Internship am Tierspital der Universität Zürich, Klinik für Kleintierchirurgie
Juni 2009 bis heute	Notfall- Assistentin der Kleintierklunik des Tierspitals, Universität Zürich

Zürich, den 21. Januar 2010